ZUR KENNTNIS DES DARMEREPSINS.

ÜBER DIE ENZYMATISCHE HYDROLYSE DES CLUPEINS.

Anton SCHÄFFNER.

ZUR KENNTNIS DES DARMEREPSINS.

ÜBER DIE ENZYMATISCHE HYDROLYSE DES CLUPEINS.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der philosophischen Fakultät (II.Sektion)

der

Bayrischen Ludwig-Maximilians-Universität

zu München.

Vorgelegt am 9.Februar 1927

von

Anton SCHÄFFNER

aus Landshut.

Referent: Geheimrat Professor Dr.H.WIELAND.

Tag der mündlichen Prüfung: 2.März 1927.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Meinen Eltern in Dankbarkeit!

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547414_0060

Herrn Privatdozenten Dr.E.WALDSCHMIDT-LEITZ, unter dessen Anleitung diese Arbeit entstand, danke ich für seine stete Unterstützung und Fürsorge.

Herrn Geheimrat Professor Dr.R.WILLSTÄTTER und Herrn Geheimrat Professor Dr.H.WIELAND, in deren Institut die Arbeit ausgeführt wurde, spreche ich für ihre Hilfe und ihr Entgegenkommen meinen ergebensten Dank aus.

INHALTSANGABE.

Seite

ZUR KENNTNIS DES DARMEREPSINS.

Theoretischer Teil:

I. Die Stellung des Darmerepsins im System der tierischen Proteasen 1

II. Die Darstellung proteolytisch einheitlichen Darmerepsins 2

III. Die Spezifität des Darmerepsins 3

IV. Identität von Darm- und Pankreasenzym . . 5

V. Über die Möglichkeit des Vorkommens von 2,5-Diketopiperazinen im Proteinmolekül . 7

Experimenteller Teil:

I. Bestimmung des Erepsins.

1. Zur Messung der Enzymwirkung 9

2. Abhängigkeit von der Wasserstoffzahl . 10

3. Zur Kinetik 12

4. Bestimmungsmethode 16

II. Darstellung und Verhalten des Erepsins. .

1. Zur Gewinnung der Enzymlösungen 19

2. Verhalten gegenüber Fällungsmitteln . . 21

3. Adsorptionsverhalten.

a) Adsorption durch Tonerde 25
b) Abtrennung von Trypsin 28
c) Adsorption durch Kaolin 30

III. Zur Spezifität des Erepsins.

1. Peptide 31

2. Peptone und Proteine 33

IV. Beständigkeit von Glycinanhydrid gegenüber proteolytischen Enzymen bei physiologischen Bedingungen 34

V. Beständigkeit von Glycinanhydrid bei physiologischem p_H 36

Seite

ÜBER DIE ENZYMATISCHE HYDROLYSE DES CLUPEINS.

Theoretischer Teil:

I. Geschichte des Clupeins, seine Zusammensetzung und frühere Versuche einer partiellen Hydrolyse 38

II. Die Anwendung einheitlicher proteolytischer Enzyme zur fraktionierten enzymatischen Hydrolyse des Clupeins 41

III. Die Hydrolyse des Clupeins durch Trypsin, Trypsin-Kinase und Erepsin in wechselnder Reihenfolge 42

IV. Die Hydrolyse des Clupeins durch die tierischen Proteasen bei Einschaltung von Papain-Blausäure 47

V. Ergebnisse der Untersuchung und Schlußfolgerung über den Aufbau des Clupeins 50

Experimenteller Teil:

I. Zur Darstellung des Ausgangsmaterials.

1. Clupeinsulfat 54

2. Zur Trennung von Trypsin und Erepsin . . . 55

3. Darstellung kinasefreien Trypsins 58

II. Enzymatische Hydrolyse des Clupeins 62

ZUR KENNTNIS DES ERYPSINS.

Theoretischer Teil.

Das wichtige und oft untersuchte, zuerst von O.COHNHEIM[1] im Jahre 1901 beschriebene Erepsin der Darmschleimhaut hat als der einfachste Vertreter tierischer Proteasen zu gelten, als eine der wenigen, deren Wirkung sich auf Substrate bekannter Konstitution beziehen lässt; es ist zu erwarten, dass diesem Enzym, dessen spezifische Wirkungen am leichtesten zu beschreiben und abzugrenzen sind, bei der Erkennung und Lösung struktureller Fragen in der Proteinchemie eine hervorragende Rolle zufallen wird. Schon die grundlegenden Beobachtungen von COHNHEIM liessen erkennen, dass das Erepsin die Aufspaltung der niedrigeren Eiweissabbauprodukte, der Peptide, in die einfachsten Bausteine, die Aminosäuren, vollzieht. Seine besondere Existenz wurde des öfteren angezweifelt und seine Wirkungen sind nicht sicher genug von denen des pankreatischen Trypsins unterschieden worden, zumal man für die Pankreasdrüse und ihre Sekrete vielfach die nämlichen enzymatischen Wirkungen wahrnahm. Später schrieb man diese einem besonderen ereptischen Enzym in der Drüse zu.

Die Unterscheidung der Literatur[2] zwischen den spezifischen Substraten des Pankreastrypsins und des Pankreaserepsins, die man auf Grund der jeweiligen

---

1) Z.S. Bd. 33, S.431 (1901).

2) Vgl. G.SCHAEFFER u.E.TERROINE, Jl.de Physiol et Pathol.gén. Bd. 12, S. 905 (1910).

Aktivierbarkeit ihrer Spaltung durch den Trypsinaktivator Enterokinase vornahm, ist in einer Arbeit von E.WALDSCHMIDT-LEITZ und A.HARTENECK[1] mit der Trennung der beiden Enzyme und mit der Kennzeichnung ihrer Einzelwirkungen widerlegt und richtig gestellt worden. Aber auch die Angaben der Literatur über die besonderen Wirkungen des Darmerepsins, das man, z.B. in seinen Auszügen aus der Schleimhaut, als proteolytisch einheitlich ansah, haben sich als unzuverlässig erwiesen.

Wenn die Forschung unter den spezifischen Substraten des Darmerepsins die meisten synthetischen Polypeptide sowie die Peptone[2] und ferner Protamine[3], Histone[4] und Casein[5] zusammenfasste, so ergaben sich aus dieser Zusammenstellung gewisse Hinweise auf gemeinsame strukturelle Besonderheiten dieser Körper; so hat man beispielsweise die Peptone der Pepsinverdauung als ein Gemisch von Polypeptiden angesehen oder man glaubte der Struktur der Protamine als einfacher gebauter Proteine polypeptidähnlichen Charakter zusprechen zu können. Die angeführten Beobachtungen über die Spaltung von Pepton und gewissen Proteinen durch Erepsin haben sich indessen als unzutreffend erwiesen, sie sind nämlich auf die Uneinheitlichkeit der angewandten Enzympräparate zurückzuführen. Die Lösungen des ereptischen Enzyms, die man aus der Darmschleimhaut gewinnt, enthalten stets

---

1) H.S. Bd.147, S.286 (1925); Bd.149, S.203 (1925).

2) Vgl. O.COHNHEIM, a.a.O.; J.WOHLGEMUTH, Grundriss der Fermentmethoden, Berlin 1913, S.199 ff.

3) Vgl. O.COHNHEIM, H.S. Bd.35, S.134 (1902); F.ROGOZINSKI, ebenda Bd.79, S.398 u.zwar S.413 (1912); A.CLEMENTI, Biochem.Zs. Bd.136, S.71 (1922/23).

4) Vgl.O.COHNHEIM, a.a.O.

5) Vgl.O.COHNHEIM, a.a.O.; A.CLEMENTI, a.a.O.; siehe dagegen E.HEDON u. L.HEDON, Soc.Biol. Bd.88, S.1062 (1923).

wechselnde, wenn auch oft geringe Beimengungen von pankreatischem Trypsin, dessen Gegenwart eine Angreifbarkeit besonders leicht spaltbarer Substrate durch das Erepsin selbst vorzutäuschen vermag. Die vorliegende Untersuchung, die das Erepsin hinsichtlich seiner Bestimmung, seiner Eigenschaften und seiner spezifischen Wirkungen beschreibt, gibt ein Verfahren der Darstellung des trypsinfreien, proteolytisch einheitlichen Enzyms, ein Verfahren, das die von E.WALDSCHMIDT-LEITZ und A.HARTENECK[1] mitgeteilte Trennung von Pankreastrypsin und Pankreaserepsin zum Vorbilde nimmt und das wie diese auf der Anwendung der fraktionierten Adsorption mittels Tonerde beruht; das Verhalten des Darmerepsins gegenüber diesem Adsorbens stimmt nämlich mit dem des Pankreaserepsins überein.

Es hat sich ergeben, dass das enzymatisch einheitliche Erepsin spezifisch auf die Hydrolyse gewöhnlicher Peptide und nur auf diese eingestellt ist; weder ein Pepton der Pepsinverdauung noch ein Protamin oder Histon, noch irgend ein anderes Protein wird durch das reine Enzym gespalten, die Aussagen der Literatur über die Angreifbarkeit solcher Substrate sind auf beigemengtes Trypsin zu beziehen. Als spezifische Substrate zum Nachweis und zur Bestimmung des Erepsins wird man entgegen vielen in der Literatur empfohlenen Verfahren[2] nur einfache Peptide, z.B. Di- oder Tripeptide, anwenden dürfen.

Ich veranschauliche die Ergebnisse meiner Versuche über die Spezifität des Darmerepsins qualitativ

---

1) H.S. Bd.147, S.286 u.zwar S.301 (1925).

2) Vgl. J.WOHLGEMUTH, Grundriss der Fermentmethoden, Berlin 1913, S.192 ff.

in nachstehender Tabelle 1, welche sie mit der von ALDSCHMIDT-LEITZ und HARTENECK untersuchten Spezifität des Pankreaserepsins und des Pankreastrypsins zu vergleichen gestattet.

Tabelle 1.

Spezifität von Darmerepsin, Pankreaserepsin und Pankreastrypsin. (Angaben bedeuten: - = keine nachweisbare, + = positive Hydrolyse.)

Nr.	Substrat	Enzym		
		Darm-erepsin	Pankreas-erepsin	Pankreas-trypsin (akt.)
1	Alanyl-glycin	+	+	-
2	Glycyl-tyrosin	+	+	-
3	Glycyl-glycin	+	+	-
4	Leucyl-glycin	+	+	-
5	Leucyl-alanin	+	+	-
6	Pepton (ex albumine, Merck)	-	-	+
7	Clupein	-	-	+
8	Thymushiston	-	-	+
9	Casein	-	-	+
10	Fibrin	-	-	+
11	Gelatine	-	-	+
12	Gliadin	-	-	+
13	Zein	-	-	+
14	Eieralbumin	-	-	+
15	Ricinus-globulin	-	-	+

Der qualitative Vergleich der Spezifität des intestinalen und des pankreatischen Erepsins, den die

Tabelle wiedergibt, belässt für eine Verschiedenheit der beiden Enzyme, wie sie auf Grund der älteren Angaben von E.FISCHER und E.ABDERHALDEN[1] „Über das Verhalten verschiedener Polypeptide gegen Pankreassaft" anzunehmen war, keine Stütze; aber auch die quantitativen Belege, die im experimentellen Teil dieser Abhandlung für die Reihenfolge der Spaltbarkeit der verschiedenen Peptide und für das Verhältnis der jeweiligen Reaktionsgeschwindigkeiten angeführt werden, bieten keine Anhaltspunkte für eine solche Annahme, wenn sie auch noch durch den exakten Affinitätsvergleich zu ergänzen sein werden. Es kommt hinzu, dass sowohl das Adsorptionsverhalten der beiden Enzyme gegenüber Tonerde, wie schon erwähnt, wie auch die Abhängigkeit ihrer Aktivität von der Wasserstoffzahl, übereinstimmend[2] gefunden wird. Es ist daraus zu folgern, dass für eine Verschiedenheit der beiden Enzyme, des Darmerepsins und des Pankreaserepsins, nun keine Anhaltspunkte mehr vorliegen, dass sie vielmehr als identisch zu betrachten sind. An diese Schlußfolgerung haben E.WALDSCHMIDT-LEITZ und A.HARTENECK[3] eine weitergehende physiologische Fragestellung geknüpft und erörtert; es ist nämlich damit zu rechnen, dass die primäre Bildung auch des Darmerepsins sich in der Pankreasdrüse vollzieht, und dass seine Absonderung durch die Darmschleimhaut auf eine sekundäre Anhäufung in deren Drüsenzellen zurückzuführen ist.

Der Vergleich der spezifischen Wirkungen von Erepsin und von Trypsin anderseits, den die Tabelle

---

1) H.S. Bd.46, S.52 (1905).
2) H.S. Bd.147, S.286 u.zwar S.307 (1925).
3) H.S. Bd.149, S.221 (1925).

veranschaulicht, lässt erkennen, dass sie schärfer, als man bisher annahm, voneinander zu unterscheiden sind. Zwar wird später in der Untersuchung über die enzymatische Hydrolyse des Clupeins gezeigt werden, dass eine gewisse gegenseitige Vertretbarkeit der proteolytischen Enzyme möglich ist. Aber für die Hydrolyse einer Anzahl einfacher Peptide, die nur durch Erepsin zerlegt werden, ist ein charakteristischer Unterschied in der Spezifität des Trypsins und des Erepsins erwiesen. Und ferner ist die Feststellung erlaubt, dass die beispielsweise in den Peptonen der Pepsinverdauung, in den Protaminen und Histonen vorliegenden strukturellen Gruppierungen vom Typus der für Erepsin spezifischen einfachen Peptidbindungen verschieden sein werden. Die weitere Untersuchung der Spezifität von Trypsin wird sich ferner mit der Tatsache auseinanderzusetzen haben, dass, wie früher belegt wurde, auch das Trypsin erhebliche Mengen freier Aminosäuren abspaltet. Mit der Annahme einfacher oder polymerer Diketopiperazine als Bausteine der Proteine, die vor allem durch R.O.HERZOG[1], sowie durch E.ABDERHALDEN[2] vertreten und in neuerer Zeit auch von M.BERGMANN[3] nahegelegt worden ist, ist dieser Befund nur schwer vereinbar; denn auch mit der Annahme eines Überganges solcher polymerer Anhydride in höhere Peptide, etwa in Tetrapeptide, wie

---

1) Naturw. Bd.11, S.172 (1923).
2) Naturw. Bd.12, S.716 (1924).
3) M.BERGMANN, Naturw. Bd.13, S.799 (1925); M.BERGMANN, A.MIEKELEY u.E.KANN, Liebigs Ann.d. Chem. Bd.445, S.17 (1925).

er von BERGMANN experimentell verwirklicht und als ein Teilvorgang des enzymatischen Abbaus diskutiert wurde, ergäbe sich bei der Resistenz einfacher Peptide gegenüber Trypsin keine Beziehung zu der beobachteten Freilegung von Aminosäuren.

Auch ich habe die Möglichkeit des Vorkommens von 2,5-Diketopiperazinen im Proteinmolekül in die Spezifitätsuntersuchung des Darmerepsins einbezogen und experimentell geprüft. Man hat nämlich bei der Erörterung der Frage, ob solche Aminosäureanhydride, die zahlreich unter den Produkten der partiellen Proteinhydrolyse aufgefunden wurden, tatsächlich am Aufbau des Eiweissmoleküls teilhaben, oder ob sie aus seinen Aufbauprodukten erst sekundär entstanden seien, dem Umstande zu wenig Rechnung getragen, dass es bisher nicht gelungen ist, eine Aufspaltung solcher Diketopiperazine durch die spezifischen proteolytischen Enzyme zu beobachten.

Die bisher vorliegenden Beobachtungen der Literatur über die Spaltung von Diketopiperazinen durch proteolytische Enzyme sind nicht eindeutig. So berichtet E.ABDERHALDEN (1) über negative, F.WESSELY (2) über unsichere Ergebnisse bei der Einwirkung von Organextrakten auf einfache Anhydride; auch die von E.ABDERHALDEN und Y.TERNUCKI (3) mitgeteilten Beobachtungen an lebenden Organismen erlauben keine einfache Stellungnahme zur Frage der enzymatischen Spaltbarkeit. Daher hat E.ABDERHALDEN (4), der der Mitwirkung anhydrid-haltiger Komplexe am Aufbau der Proteine besondere Bedeutung zuschreibt, die Auffassung vertreten und experimentell behandelt, dass „weder Trypsin noch Pepsin an der Aufspaltung von anhydrid-artigen Ringsystemen beteiligt sind, diese vielmehr durch die Säure bzw. das Alkali der Verdauungssäfte erfolgt". (5)

---

1) E.ABDERHALDEN, H.S. Bd.55, S.384 (1908);
E.ABDERHALDEN u.K.GOTO, Ferment-Forschung, Bd.7, S.169 (1923).

2) H.S. Bd.135, S.117 u.zwar S.121 (1924).

3) E.ABDERHALDEN u.Y.TERNUCKI, H.S.Bd.47, S.162 (1906);
E.ABDERHALDEN, H.S. Bd.57, S.325 (1908).

4) E.ABDERHALDEN, Pflügers Archiv, Bd.201, S.1 (1923);
E.ABDERHALDEN u.K.GOTO, Fermentforschung, Bd.7, S.169 (1923).

5) Ferment-Forschung, Bd.7, S.169 u.zwar S.170 (1923).

Die Versuche dieser Abhandlung haben zu dem Ergebnis geführt, dass eine Aufspaltung einfacher Diketopiperazide unter physiologischen Bedingungen nicht zu beobachten ist.

Die bekannten proteolytischen Enzyme des tierischen Verdauungstrakts, Pepsin, Trypsin und Erepsin, bewirken keine nachweisbare Zerlegung, ebensowenig pflanzliche Enzyme, wie das Papain oder die Proteasen des Hefepilzes. Sodann hat es sich gezeigt, dass entgegen der von E.ABDERHALDEN[1] entwickelten Anschauung der Diketo-piperazin-Ring bei der Reaktion der tierischen Verdauungssekrete weitgehende Beständigkeit aufweist, sei es bei der normalen Acidität des Magensaftes, sei es bei der Konzentration der Hydroxyl-Ionen im Darm. Für eine durchgreifende Aufspaltung von Anhydridringen unter den Bedingungen der tierischen Verdauung ergeben meine Befunde keinen Anhalt.

Wenn neuerdings E.ABDERHALDEN[2] und Mitarbeiter auf die Möglichkeit hinweisen, dass Anhydrid-Ringe in der Enolform sich am Aufbau des Eiweissmoleküls beteiligen, so wird man dieser Anschauung solange mit Zurückhaltung gegenüberstehen müssen, bis eine enzymatische Spaltung an einem derartigen Anhydridmodell einwandfrei durchgeführt ist. Das gleiche gilt auch für die synthetisch hochmolekularen Produkte, die M.BERGMANN[3] durch Polymerisierung von isomeren Diketopiperazinen gewonnen hat.

---

1) E.ABDERHALDEN, Pflügers Arch., Bd.201, S.1 (1923); E.ABDERHALDEN u.K.GOTO, Fermont-Forschung, Bd.7, S.169 (1923).

2) E.ABDERHALDEN u.E.SCHWAB, H.S. Bd.149, S.100 (1925).

3) M.BERGMANN, A.MIEKELEY u.E.KANN, Liebigs Ann.d.Chem. Bd.445, S.17 (1925).

Experimenteller Teil.

I. Bestimmung des Erepsins.

1. Zur Messung der Enzymwirkung.

Für die Messung der Wirkung proteolytischer Enzyme, beispielsweise des Trypsins oder des Papains, hat sich das Verfahren der alkalimetrischen Titration der freigelegten Carboxyle in alkoholischer Lösung nach R. WILLSTÄTTER und E. WALDSCHMIDT-LEITZ[1] bewährt. Für die Bestimmung des Erepsins ergeben sich jedoch aus der unabgeänderten Übertragung dieses Verfahrens, der Titration z.B. in 90 %igem Äthylalkohol, gewisse Störungen, die sich aus der Notwendigkeit herleiten, zur Einstellung und Aufrechterhaltung der für die Enzymwirkung günstigen Wasserstoffzahl Phosphatmischungen stärkerer Konzentration anzuwenden; ihre Schwerlöslichkeit in dem angewandten Solvens beeinträchtigt nämlich die Genauigkeit der Titration. Es hat sich daher für die Messung des Erepsins als zweckmässig erwiesen, die Enzymwirkung, die in der Zunahme der Acidität zum Ausdruck kommt, unter Anwendung von Methylalkohol, und zwar bei einem Gehalt von 80 - 85 %, alkalimetrisch zu bestimmen; bei dieser Konzentration an Methylalkohol, bei der unter unseren Versuchsbedingungen keine Ausfällung phosphorsauren Salzes wahrgenommen wird, lassen sich bei Anwendung von Thymolphtalein als Indicator die Carboxyle von Aminosäuren und Peptiden, wie nachstehende Beispiele erweisen, ebenfalls vollständig titrieren.

---

1) Chem. Ber. Bd.54, S. 2988 (1921).

Alkalimetrische Bestimmung von Aminosäure und Peptid in 80 %igem Methylalkohol.

a) Glykokoll. 0,2000 g Glykokoll löste man in 20 ccm H_2O; nach Zusatz von 80 ccm Methylalkohol + 1,0 ccm 0,5 %iger Alkohol. Lösung von Thymolphtalein erforderten sie 13,38 ccm 0,2 n. 90 %iger alkoholischer Lauge statt ber. 13,15 ccm.

b) Glycyl-glycin. 0,0800 g Glycyl-glycin, in 20 ccm H_2O + 80 ccm Methylalkohol gelöst, titrierte man nach Zusatz von 1,0 ccm 0,5 %igem Thymolphtalein; sie verbrauchten 3,12 ccm 0,2 n-KOH (und ebensoviel in 90 %iger äthylalkoholischer Lösung) statt ber. 3,03 ccm.

2. Abhängigkeit von der Wasserstoffzahl.

Das p_H-Optimum des Darmerepsins haben P.RONA und F.ARNHEIM[1], wenn auch an einem ungeeigneten, nicht für dieses Enzym spezifischen Substrate, sowie K.G.DERNBY[2] an einem einfachen Peptid, Glycyl-glycin, zu 7,8 gefunden; DERNBY hat auch auf die grosse Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von der Wasserstoffzahl sowie auf die Änderungen der Acidität unter dem Einfluss der enzymatischen Reaktionsprodukte aufmerksam gemacht. Seine Angaben haben sich in unseren Versuchen bestätigt. Der starke Einfluss der Acidität auf die Wirksamkeit des Enzyms macht es erforderlich, seine Messungen entweder auf den ersten Bereich der Hydrolyse zu beschränken oder aber die Einhaltung konstanter Wasserstoffzahl durch Anwendung grösserer Puffermengen zu sichern. Das

---

1) Biochem.Zs., Bd.57, S.84 (1913).

2) Biochem.Zs., Bd.81, S.107 (1916/17).

Optimum der Wirkung fand man, wie aus Tabelle 2 hervorgeht, für die Spaltung zweier untersuchter Dipeptide, von Glycyl-glycin wie von Leucyl-glycin, übereinstimmend und scharf bei $p_H = 7,8$.

Zu den in der Tabelle angeführten Versuchen verwandte man je 0,66 ccm Glycerinauszug aus Darmschleimhaut, auf 2,0 ccm mit Wasser verdünnt, 0,001 Mol Peptid, sowie 5,0 ccm 0,2 mol.-Phosphatpuffer von $p_H = 7,8$ mit wechselnden Mengen 0,2 n-NaOH, bzw. HCl in einem Gesamtvolumen von 10,0 ccm; die Bestimmung der Wasserstoffzahl erfolgte mittels der Indicatorenmethode.

Tabelle 2.

p_H-Abhängigkeit des Darmerepsins.

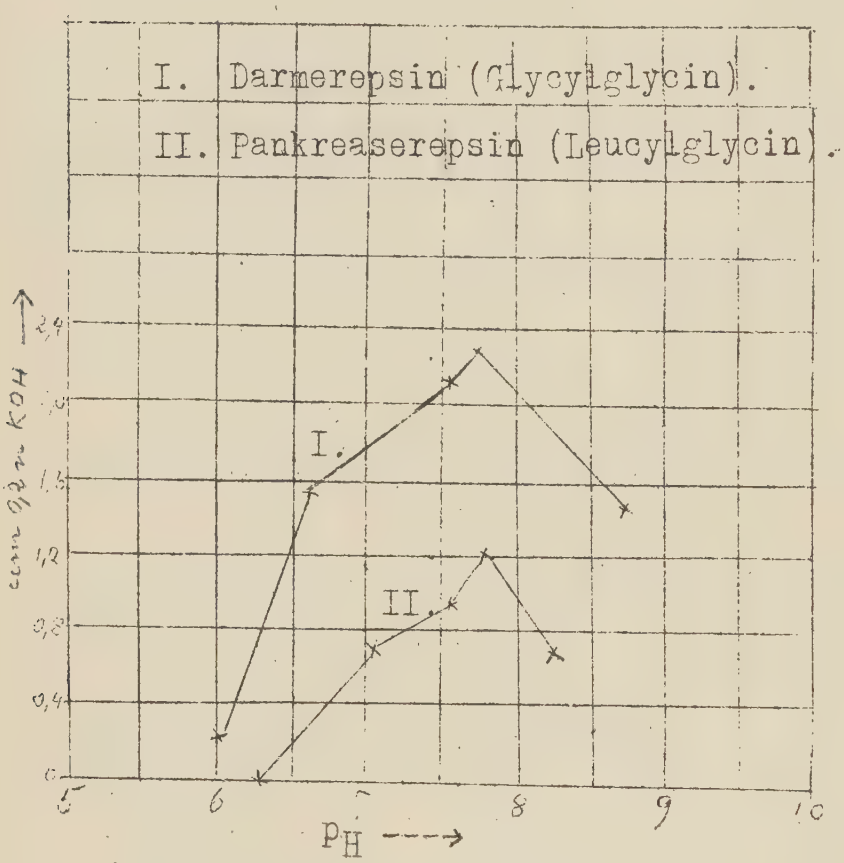
(1 Stunde; 30°; Angaben bedeuten Aciditätszuwachs in ccm 0,2 n-KOH).

p_H	Substrat	
	Glycyl-glycin	Leucyl-glycin
5,0	0,00	-
6,0	0,25	-
6,6	1,45	-
6,8	-	1,13
7,0	1,95	-
7,4	-	2,25
7,6	2,10	-
7,8	2,25	2,43
8,0	-	2,20
8,2	1,55	-

Die für Darmerepsin optimale Wasserstoffzahl fällt mit der von E. WALDSCHMIDT-LEITZ und A. HARTENECK[1])

für das pankreatische Enzym ermittelten zusammen; auch lässt der Verlauf der Aktivitäts-p_H-Kurve, wie aus nachstehender Figur ersichtlich, keine deutlichen Unterschiede zwischen den beiden Enyzmen erkennen.

Aktivitäts-p_H-Kurve von Darm- und Pankreaserepsin.



3. Zur Kinetik.

Der Reaktionsverlauf enzymatischer Peptidspaltungen ist schon öfter, aber mit wechselnden Ergebnissen beschrieben worden. Während die Untersuchungen von H.v.EULER[1], sowie von K.G.DERNBY[2] über die Hydrolyse von Clycyl-glycin durch tierisches Erepsin zur Aufstellung monomolekularer Reaktionsgleichungen führten, geben E.ABDERHALDEN und A.FODOR[3] an, dass der zeitliche

---

1) H.S., Bd.51, S.213 (1907).
2) Biochem.Zs., Bd.81, S.107 (1916/17).
3) Fermentforschung, Bd.1, S.533 u.zwar S.549 (1916).

Verlauf der Peptidhydrolyse durch pflanzliches Enzym, aus Hefepreßsaft, in hohem Maße von der Wasserstoffzahl abhänge; die älteren Ergebnisse von E.ABDERHALDEN und L.MICHAELIS[1] über die Hydrolyse durch Hefeenzym, nach welchem der Reaktionsverlauf durch die Summe einer logarithmischen und einer linearen Funktion des Umsatzes ausgedrückt wird, sowie die neueren Aussagen von DERNBY über die Gültigkeit der Gleichung erster Ordnung auch für pflanzliches Enzym erscheinen danach nur als Spezialfälle. Dieses Verhalten erinnert an die bei dem rohrzuckerspaltenden Enzym der Hefe beobachteten Erscheinungen wechselnder Kinetik, deren Abhängigkeit von der Acidität durch R.WILLSTÄTTER, J.GRASER und R.KUHN[2] beschrieben worden ist. Der Einfluss der Wasserstoffzahl scheint bei dem peptidspaltenden Enzym noch ausgeprägter zu sein; er gilt indessen nicht für die Wirkung des tierischen Enzyms. Die Ergebnisse meiner Versuche bestätigen die Angaben von v.EULER und von DERNBY über die Gültigkeit der Reaktionsgleichung erster Ordnung und zwar für die Hydrolyse von Leucyl-glycin durch Darmerepsin, und sie erweitern sie mit der Feststellung, dass diese Beziehung unabhängig von der Wasserstoffzahl beobachtet wird. Es hat den Anschein, dass der Reaktionsmechanismus des tierischen und des pflanzlichen Enzyms sich unterscheidet oder dass die Affinität des Hefeerepsins zu seinen Substraten in stärkerem Maße von Begleitstoffen beeinflusst wird.

Ich stelle die Versuche in den folgenden Tabellen 3 bis 5 zusammen, die den Reaktionsverlauf bei

---

1) H.S., Bd.52, S.326 (1907).
2) H.S., Bd.123, S.1 u.zwar S.65 (1922).

p_H = 7,8, p_H = 7,0 und p_H = 6,6 vergleichen; die angegebenen Konstanten der monomolekularen Reaktionsgleichung beziehen sich auf die in den Analysenproben enthaltenen Peptidmengen. Sie stimmen, wie aus den Tabellen hervorgeht, bis zu höheren Spaltungsgraden innerhalb der Fehlergrenzen überein; erst wenn der angewandte Puffer zur Aufrechterhaltung der Wasserstoffzahl nicht mehr ausreicht, nämlich bei Hydrolysen von mehr als 60 %, sind Störungen im Reaktionsverlauf zu bemerken.

Entgegen den Angaben von E.ABDERHALDEN und A.FODOR[1] beobachtete K.G.DERNBY[2] für Hefe wie für Darmerepsin direkte Proportionalität zwischen Enzymmenge und Reaktionsgeschwindigkeit; sie bestätigt sich auch unter unseren Versuchsbedingungen, und zwar in einem Bereiche der Enzymmengen wie 1 : 10. Nur bei der Wirkung sehr kleiner Enzymmengen wird diese Beziehung nicht mehr beobachtet, hier findet man die Enzymwirkung verhältnismässig geringer. Diese Abweichungen, die die Tabelle 6 (S.16) veranschaulicht, mögen auf den Einfluss der Enzymzerstörung zurückzuführen sein, zumal sich in diesem Falle zugleich eine frühzeitige, beträchtliche Abnahme der Reaktionskonstanten bemerkbar macht.

---

1) Fermentforschung, Bd.1, S.533 u.zwar S.579 (1916).

2) Biochem.Zs., Bd.81, S.107 u.zwar S.185, 186 (1916/17).

Tabelle 3.

Reaktionsverlauf bei $p_H = 7,8$.

(1,320 g Glycyl-glycin, 16,0 ccm Glycerinauszug aus Schleimhaut im Gesamtvolumen von 100 ccm; p_H eingestellt durch 50,0 ccm 0,2 mol.-Phosphatpuffer von $p_H = 7,8$ + 18,8 ccm 0,2 n-NaOH; 30°; zur Analyse entnommen je 10,0 ccm).

t Min.	Aciditätszunahme ccm 0,2n-KOH	Spaltung %	$k = \frac{1}{t} \cdot \log_{10} \frac{a}{a - x}$
30	0,92	17	0,00270
60	1,65	30	0,00263
120	2,88	53	0,00276
240	3,82	71	0,00220

Tabelle 4.

Reaktionsverlauf bei $p_H = 7,0$.

(0,660 g Glycyl-glycin, 15,0 ccm Glycerinauszug, im Gesamtvolumen von 50,0 ccm; p_H eingestellt durch 25,0 ccm 0,2 mol.-Phosphatpuffer von $p_H = 7,8$ + 4,5 ccm 0,2 n-NaOH; 30°; zur Analyse entnommen je 10,0 ccm).

t Min.	Aciditätszunahme ccm 0,2n-KOH	Spaltung %	$k = \frac{1}{t} \cdot \log_{10} \frac{a}{a - x}$
38	1,28	23	0,00309
60	1,84	36	0,00290
120	3,02	56	0,00296

Tabelle 5.

Reaktionsverlauf bei $p_H = 6,6$

(0,660 g Glycyl-glycin, 15,0 ccm Glycerinauszug, im Gesamtvolumen von 50,0 ccm; p_H eingestellt durch 25,0 ccm 0,2 mol.-Phosphatpuffer von $p_H = 7,8$; 30°; zur Analyse entnommen je 10,0 ccm).

t Min.	Aciditätszunahme ccm 0,2 n-KOH	Spaltung %	$k = \frac{1}{t} \cdot \log_{10} \frac{a}{a - x}$
60	1,25	23	0,00190
120	2,22	41	0,00192
180	2,99	55	0,00195

Tabelle 6.

Enzymmenge und Reaktionsgeschwindigkeit.

Enzymmenge	t Min.	Aciditätszunahme ccm 0,2n-KOH	Spaltung %	$k = \frac{1}{t} \cdot \log_{10} \frac{a}{a-x}$
32,0 ccm Auszug I	15	0,42	15	0,0048
" "	30	0,85	31	0,0053
" "	60	1,40	51	0,0051
16,0 ccm "	30	0,40	15	0,0027
" "	60	0,81	29	0,0025
" "	120	1,45	52	0,0027
8,0 ccm Auszug II	60	0,62	11	0,00088
" "	120	1,15	21	0,00087
" "	240	2,04	38	0,00086
" "	480	3,40	60	0,00086
4,0 ccm "	120	0,63	12	0,00045
" "	240	1,19	22	0,00045
" "	480	2,03	38	0,00043
" "	960	2,93	54	0,00035
2,0 ccm "	240	0,55	10	0,00019
" "	480	0,90	16	0,00016
" "	960	1,30	24	0,00012
1,0 ccm "	480	0,20	4	0,00003
" "	960	0,27	5	0,00002

4. Bestimmungsmethode.

Die Bestimmung des Darmerepsins führt man aus bei der für seine Wirkung günstigsten Wasserstoffzahl von $p_H = 7,8$; ihr liegt die Einwirkung des Enzyms auf ein Dipeptid, Glycyl-glycin, zugrunde, dessen Hydrolyse man durch die alkalimetrische Messung der freigelegten Carboxyle in 85 %iger methylalkoholischer Lösung verfolgt.

Ausführung der Bestimmung. 0,1320 g Glycyl-glycin = 0,001 Mol löst man in 5,00 ccm 0,2 mol.-Phosphatpuffer von p_H = 7,8 auf und bringt die Lösung durch Zugabe von 0,2 n-Natronlauge, deren Menge (gewöhnlich 1,80 ccm) in einem Vorversuch nach Zugabe des Enzyms ermittelt wird, auf das gewünschte p_H von 7,8. Nun setzt man die zu prüfende Enzymlösung hinzu und belässt das auf 10,0 ccm mit Wasser verdünnte Reaktionsgemisch im Thermostaten von 30°. Nach Ablauf der Versuchsdauer unterbricht man die Enzymwirkung durch Eintragen in 130 ccm Methylalkohol und titriert das Verdauungsgemisch nach dem Zusatz von 1,0 ccm 0,5 %igen Thymolphtalein + 20 ccm H_2O, also bei einem Methylalkoholgehalte von 85 %, mit 0,2 n-, 90 %iger alkoholischer Kalilauge bis zum Auftreten der ersten schwachblauen Indicatorfärbung; bei dieser Reaktion liegt das Phosphat der Pufferlösung als sekundäres Salz vor. Man hat zu jeder Bestimmung eine Leeranalyse auszuführen, deren Alkaliverbrauch von dem des Hauptversuchs in Abrechnung zu bringen ist; der verbleibende Aciditätszuwachs entspricht dann der entstandenen Menge Glykokoll.

Störungen der Bestimmung, wie sie zufolge den Angaben von K.G.DERNBY[1] durch die Anwesenheit gewisser anorganischer Salze, z.B. in den angewandten Enzymlösungen, zu erwarten wären, sind nicht in Betracht zu ziehen. Einmal haben die Beobachtungen DERNBYs über die Hemmung der Erepsinwirkung durch Salze sich nur zum Teil bestätigen lassen, nämlich nur für den Einfluss von Erdalkalisalz und von Phosphat, nicht dagegen für einfache Alkalisalze, auch nicht in grösserer Konzentra-

---

1) Biochem.Zs., Bd.81, S.107 u.zwar S.194 (1916/17).

tion; sodann wird die Gegenwart grösserer Mengen Phosphate in der Bestimmungslösung, die die Enzymwirkung nach meinen Erfahrungen auf etwa 1/3 herabsetzt, eine gewisse ausgleichende Hemmung bewirken, die den Einfluss anderer Salze auszuschalten vermag.

Die Enzymmenge ist für eine Bestimmung so zu wählen, dass die gemessene Reaktionskonstante zwischen 0,005 und 0,0005 liegt, und die Messung soll nicht über eine 60 %ige Hydrolyse des Peptids ausgedehnt werden; für höhere Spaltungsgrade erweist sich nämlich der angewandte Puffer als unzureichend.

Auf dem monomolekularen Verlauf der Peptidhydrolyse und auf den erkannten Beziehungen zwischen Enzymmenge und Reaktionsgeschwindigkeit beruhen die vorgeschlagenen Maße für Menge und Konzentration des Erepsins. Als „Erepsin-Einheit (Er.-E.)" bezeichnet man das Tausendfache derjenigen Enzymmenge, für welche sich unter den angewandten Bedingungen die Reaktionskonstante 0,001 ergibt; diese selbst drückt also die Anzahl der Erepsineinheiten in der analysierten Probe aus.

Als Maß der enzymatischen Konzentration dient der „Erepsin-Wert (Er.-W.)", d.i. die Anzahl Erepsineinheiten in 1 g des Präparates.

Beispiel. 2,00 ccm eines mit Wasser verdünnten, rohen Glycerinauszuges der Darmschleimhaut bewirkten bei der Einwirkung auf 0,1320 g Glycyl-glycin unter den Bedingungen dieser Bestimmung in 1 Stunde Hydrolyse entsprechend einem Aciditätszuwachs von 1,31 ccm 0,2 n-KOH; hieraus berechnet sich die Reaktionskonstante k = 0,00205, und dies ist die Anzahl der Er.-E. in der angewandten Menge der Enzymlösung.

40,0 ccm der Lösung mit 0,0410 Er.-E. hinterliessen nach der Dialyse 0,2662 g Trockenrückstand, entsprechend dem Erepsinwert Er.-W. = 0,154.

II. Darstellung und Verhalten des Erepsins.

1. Zur Gewinnung der Enzymlösungen.

Die geringe Beständigkeit des Erepsins lässt unter den für seine Darstellung in Betracht kommenden Methoden keine grosse Auswahl zu. So ist die direkte Trocknung der rohen Darmschleimhaut, beispielsweise mit organischen Lösungsmitteln, wie sie sich bei anderem enzymatischen Ausgangsmaterial bewährt hat, hier mit einer fast völligen Zerstörung des Enzyms verbunden, sie lässt sich also für seine Darstellung nicht verwenden.

Versuch 1. 45 g gewaschene und fein zerriebene Darmschleimhaut von Schweinen, enthaltend 0,26 Er.-E. (0,20 g : 2,68 ccm 0,2 n-KOH (60 Min.); k = 0,0023), trocknete man durch Anschütteln nacheinander mit 100 ccm Aceton, Aceton, Aceton-Äther, Äther und Äther; die getrocknete Substanz (insgesamt 7 g) wies fast keine ereptische Wirkung mehr auf (0,050 g : 0,10 ccm 0,2 n-KOH (120 Min.)).

Als Verfahren zur Gewinnung wirksamer Enzymlösungen aus der Schleimhaut eignet sich nach meinen Erfahrungen in besonderem Maße die schon von H.v.EULER[1] empfohlene Extraktion mit Glycerin oder wasserhaltigem Glycerin, sie ist der in anderen Untersuchungen angewandten Extraktion mit wässrigen Mitteln[2], z.B. mit

---

1) H.S., Bd.51, S.213 (1907).

2) Vgl. Fr.E.RICE, Jl.Amer.Chem.Soc., Bd.37, S.1319 (1915).

verdünntem Alkali, weit überlegen; der nachstehende Versuch 2., der die Enzymausbeuten bei der Anwendung von wasserhaltigem Glycerin und von verdünnter Sodalösung für die Extraktion vergleicht, erweist, dass bei letzterem Verfahren sehr grosse Enzymverluste eintreten.

Versuch 2. 2,0 g frische Darmschleimhaut wurden mit a) 20 ccm 87 %igem Glycerin, b) 20 ccm 1 %igem Na_2CO_3 3 Stdn. extrahiert; dann filtrierte man vom Ungelösten ab. 2,00 ccm des filtrierten Auszugs wiesen a) 0,0019 [2,01 ccm 0,2 n-KOH (60 Min.)], b) 0,00027 Er.-E.[0,33 ccm 0,2 n-KOH (60 Min.)] auf, ihre Aktivität war also in der glycerinhaltigen Lösung viel höher.

Das in meinen Versuchen angewandte Verfahren der Glycerinextraktion, das auf der Abtrennung der in Glycerin suspendierten Schleimhaut mittels der Zentrifuge beruht, und zwar nach dem Verdünnen mit Wasser, ergibt günstige und nur wenig schwankende Ausbeuten an Enzym; ich beschreibe es nachstehend an einem charakteristischen Beispiel.

Versuch 3. 100 g frische Schleimhaut aus Schweinedärmen wurden in der Reibschale mit 500 ccm 87 %-igem Glycerin gut verrührt; 50 ccm dieser Aufschlämmung verdünnte man nach 1-tägigem Stehen bei Zimmertemperatur mit 150 ccm Wasser und schleuderte sie alsbald in der Zentrifuge ab (5 Min.bei 4000 Umdrehungen), während die verbleibende Glycerinsuspension, in der das Enzym monatelang haltbar war, aufbewahrt wurde; 2,00 ccm der überstehenden, noch etwas getrübten Enzymlösung enthielten zufolge der Bestimmung 0,00205 Er.-E. [1,31 ccm 0,2 n-KOH (60 Min.)] bei einem Gehalte an Trockengewicht

entspr. 0,0133 g (Er.-W. = 0,154) und die gesamte Ausbeute in 150 ccm der Lösung belief sich auf 0,154 Er.-E.

Die Haltbarkeit des Erepsins, auch in den mit Wasser verdünnten Glycerinlösungen, ist, verglichen mit der rein wässriger Rohauszüge, beträchtlicher; das Enzym wird nämlich durch Glycerin stabilisiert.

Versuch 4. 2,00 ccm.

a) von mit Wasser verdünnter Glycerinsuspension,

b) von wässrigem Auszug der Schleimhaut, deren Acidität zwischen p_H = 6,0 und p_H = 6,6 lag,

bewirkten sofort nach der Darstellung, bzw. nach 18-tägiger Aufbewahrung bei Zimmertemperatur Hydrolyse entsprechend einem Aciditätszuwachs von a) 1,75 bzw. 1,75 und b) 2,05 bzw. 1,85 ccm 0,2 n-KOH oder a) 0,00025 bzw. 0,0025 und b) 0,0030 bzw. 0,0027 Er.-E.; der wässrige Auszug hatte also 10 % an Aktivität eingebüsst.

2. Verhalten gegenüber Fällungsmitteln.

Zur Reinigung des Erepsins in seinen rohen Lösungen hat man in der Literatur vor allem die Anwendung einer Fällung mit verdünnter Säure[1], sowie die Ausfällung des Enzyms selbst mit Alkohol[2] oder auch seine Aussalzung, z.B. mit Ammonsulfat[3], empfohlen; aber die Beurteilung der dadurch erzielten Reinigungen wird erschwert durch den Mangel an Angaben über die quantitativen Ausbeuten bei diesen Ope-

---

1) Vgl. S.KOBZARENKO, Biochem.Zs., Bd.66, S.344 (1914); Fr.E.RICE, Jl.Amer.Chem.Soc., Bd.37, S.1319 (1915).

2) Vgl. H.v.EULER, H.S., Bd.51, S.213 (1907).

3) Vgl. S.KOBZARENKO, a.a.O.; Fr.E.RICE, a.a.O.

rationen. Es hat sich in den Versuchen, die das Verhalten des Erepsins in den rohen, glycerinhaltigen Auszügen bei der Fällung mit verdünnter Essigsäure, durch Alkohol oder Aceton, ferner durch Schwermetallsalze und endlich bei der Aussalzung mit Ammonsulfat vergleichen, gezeigt, dass allein die Abtrennung von Eremdstoffen durch die Einwirkung verdünnter Säure eine geringfügige Konzentrationssteigerung des Enzyms erlaubt; in allen übrigen untersuchten Fällen, in welchen eine Ausfällung des Enzyms aus seinen Lösungen beobachtet wird, verhindert seine überaus grosse Empfindlichkeit gegenüber Formveränderungen und seine Unbeständigkeit eine präparative Auswertung; die gemessenen bedeutenden Enzymverluste haben zur Folge, dass keine Steigerung des Reinheitsgrades festzustellen ist, wenn nicht sogar das Enzym, wie es für die Einwirkung von Quecksilbersalz zu gelten scheint, durch das Schwermetallion eine vollständige Inaktivierung erfährt.

Ich gebe im folgenden eine kurze Beschreibung der erhaltenen Ergebnisse; nur die Vereinigung der Enzymlösungen mit Essigsäure, die in Versuch 5 veranschaulicht wird und die auch der Einwirkung der übrigen geprüften Fällungsmittel vorausgeht, besitzt präparative Bedeutung.

Versuch 5. Fällung mit Essigsäure. 10,0 ccm Rohlösung (d.i. mittels Wasser geklärter Glycerinauszug aus Schleimhaut), enthaltend 0,0103 Er.-E., wurden mit 1,0 ccm 0,1 n-Essigsäure gefällt; die mittels der Zentrifuge abgetrennte Fällung wurde in 5,0 ccm 0,001 n-Ammoniak (20 % Glycerin enth.) gelöst; diese enthielten zufolge der Bestimmung 0,0024 Er.-E. [0,79 ccm 0,2 n-KOH (60 Min.)], d.i. 23 %, während in der Mutterlauge der Fällung

(11,0 ccm) 0,0065 Er.-E. [2,00 ccm : 0,80 ccm 0,2 n-KOH (60 Min.); k = 0,00118], d.i. 64 % verblieben waren.

In einem anderen gleichartigen Versuch wurde die abgeschleuderte Essigsäurefällung mittels Alkohol und Äther getrocknet und gewogen; sie betrug 0,0348 g, ihr Erepsinwert war also 0,054. Aus dem für die Ausgangslösung ermittelten Gehalt an Trockensubstanz und dem Gewichte der abgetrennten Fällung errechnet sich das Trockengewicht von 11,0 ccm der Fällungsmutterlauge zu 0,0327 g und ihr Erepsinwert zu 0,20.

Versuch 6. Fällung mit Alkohol und Aceton. 5,0 ccm einer Mutterlauge der Essigsäurefällung (mit 0,0051 Er.-E.) fällte man a) mit 50 ccm abs. Alkohol, b) mit 50 ccm Aceton; den in der Zentrifuge abgeschleuderten Niederschlag von a) 0,0206 g bestimmt durch Trocknung mit Alkohol und Äther, löste man in 5,0 ccm 10 %igem Glycerin; die Lösung enthielt dann noch a) 0,0014 [0,90 ccm 0,2 n-KOH (60 Min.)], b) 0,00042 Er.-E. [0,30 ccm 0,2 n-KOH (60 Min.)], die Enzymausbeute belief sich also auf a) 28, b) 8 % der Ausgangslösung und die enzymatische Konzentration entsprach einem Erepsinwert von a) 0,069 und b) 0,019.

Versuch 7. Fällung mit Quecksilber und Bleisalz. 10,0 ccm Essigsäuremutterlauge (enth. 0,0078 Er.-E.) wurden a) mit 1,5 ccm 1 %igem Sublimat, b) mit 1,5 ccm 2 %igem Bleiessig gefällt; die in der Zentrifuge abgetrennte Fällung eluierte man sodann durch Anreiben in den Zentrifugengläsern und Wiederabschleudern mittels 10,0 ccm 0,2 mol-Phosphatpuffer von

p_H = 8,2. In der Restlösung war in keinem Fall mehr ereptische Wirkung nachweisbar und die gewonnene Elution enthielt in 10 ccm a) 0 und b) 38 %; durch Quecksilbersalz war also das Enzym vollständig vergiftet.

Versuch 8. Fällung mit Uransalz. Aus 40 ccm Essigsäuremutterlauge (mit 0,028 Er.-E.) schlug man durch Zusatz von 6,0 ccm 2 %igem Uranylacetat das Erepsin vollständig nieder (4,00 ccm der Restlösung: keine Aciditätszunahme); die in der Zentrifuge abgetrennte und mit 40 ccm 0,2 mol.-Phosphatpuffer von p_H = 8,2 eluierte Fällung gab an das Eluens insgesamt 0,017 Er.-E. [4,00 ccm 1,10 ccm 0,2 n-KOH (60 Min.), k = 0,0017], d.i. 60 % der Ausgangslösung, ab.

20,0 ccm dieser Elution (enth. 0,0085 Er.-E.) befreite man durch Zusatz von 20,0 ccm n-Ammoniak-Ammonchloridpuffer von p_H = 9,2 + 7,8 ccm 0,4 mol.-Magnesiumacetat unter Eiskühlung und darauffolgende Filtration vom Phosphat und neutralisierte sie mittels 20,4 ccm 0,1 n-Essigsäure; sie enthielten dann in 74 ccm noch insgesamt 0,0068 Er.-E. [10,0 ccm : 0,80 ccm 0,2 n-KOH (60 Min.); k = 0,00092], der bei der Phosphatfällung eingetretene Verlust belief sich demnach auf 20 %.

40 ccm der phosphatfreien Lösung (mit 0,00368 Er.-E.) wurden durch 7-tägige Dialyse in einer sogen. Fischblase unter Toluol gegen fliessendes dest. Wasser unter Rührung mit Stickstoff vom Glycerin und von Salzen befreit; sie hinterliessen nach dem Abdampfen auf dem Wasserbad 0,1200 g Trockenrückstand entsprechend dem Erepsinwert 0,030, die enzymatische Konzentration war also durch die

Uranfällung scheinbar erheblich gesunken.

Versuch 9. Aussalzung mit Ammonsulfat. 20,0 ccm einer Mutterlauge der Essigsäurefällung (enth. 0,014 Er.-E.) wurden mit 0,1 n-NH_3 neutralisiert und durch Zusatz von 60 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung unter Eiskühlung gefällt; den auf der Nutsche mittels Kieselgurhaut abgesaugten und mit ammonsulfathaltigem Glycerinwasser gewaschenen Niederschlag löste man sodann in 20 ccm 20 %igem Glycerin wieder auf, er enthielt noch 0,0024 Er.-E. [4,00 ccm : 0,42 ccm 0,2 n-KOH (60 Min.); k = 0,00048], d.i. 17 % des Erepsins. Der Enzymgehalt der ausgesalzenen Mutterlauge liess sich infolge des grossen Salzgehaltes nicht bestimmen.

3. Adsorptionsverhalten.

a) Adsorption durch Tonerde. Das Adsorptionsverhalten des Darmerepsins ist bisher nur von Fr.E.RICE[1] untersucht worden, allein ohne sichere quantitative Bestimmungen. Die auffallende Aussage, dass das Enzym von Tonerde bei jeder Reaktion, und zwar quantitativ aufgenommen würde, mag in dem geringen Enzymgehalt der geprüften Lösungen und in der Anwendung eines grossen Überschusses an Adsorbens ihre Erklärung finden. Die Abhängigkeit der Adsorption durch Tonerde von der Wasserstoffzahl ist in Wirklichkeit viel ausgeprägter, sie gleicht der des Pankreaserepsins[2]: die Menge des adsorbierten Enzyms findet man bei saurer Reaktion am höchsten, während im alkalischen Gebiet fast gar keine

---

1) Jl.Amer.Chem.Soc., Bd.37, S.1319 (1915).

2) Siehe dazu E.WALDSCHMIDT-LEITZ u.A.HARTENECK, H.S., Bd.147, S.286 u.zwar S.304 (1925).

Aufnahme zu beobachten ist. Tab.7 veranschaulicht dieses Verhalten; man verwandte zur Adsorption je 10,0 ccm einer Mutterlauge der Essigsäurefällung mit 0,0075 Er.-E. [2,00 ccm : 0,90 ccm 0,2 n-KOH (60 Min.); k = 0,0015] und unterwarf sie nach Einstellung des gewünschten p_H mittels wechselnder Mengen 0,1 n-NH_3 der Einwirkung von 1,0 ccm Tonerdesuspension der Sorte C [1]) (enth. 7,5 mg Al_2O_3); die aufgenommene Enzymmenge wurde aus dem Gehalte der in der Zentrifuge abgetrennten Adsorptionsmutterlauge ermittelt.

Tabelle 7.

Tonerdeadsorption und p_H.

(Zur Analyse angewandt je 2,00 ccm Restlösung; 60 Min.)

Angew. p_H	Aciditäts-zunahme ccm 0,2 n-KOH	Erhalt. Restlös. ccm	Gehalt d. Restlösung Er.-E.	Ad-sorbiert %	Adsorptions-wert A.-W.
4,7	0,26	11,0	0,0020	72	0,73
6,0	0,47	11,5	0,0039	48	0,48
7,0	0,71	11,5	0,0064	16	0,14
8,2	0,81	12,0	0,0073	3	0,026

Durch Zusatz von Alkohol wird die Adsorption, z.B. bei p_H = 4,7, wie besondere Versuche erwiesen haben, deutlich verstärkt; allein die Empfindlichkeit des Enzyms auch gegenüber geringeren Alkoholkonzentrationen lässt für eine präparative Anwendung dieses Mittels keine Vorteile erwarten. Auch durch eine zweimalige Voradsorption von insgesamt 56 % des Enzyms, die auf Grund einer aufgenommenen Adsorptionskurve aussichtsreich erschien, wurde keine Steigerung des Adsorptionswertes erreicht.

---

1) Vgl. R.WILLSTÄTTER und H.KRAUT, Chem.Ber., Bd.56,

Die Elution des Erepsins aus den Tonerdeadsorbaten gelingt in guter Ausbeute durch Einwirkung schwach alkalischer Phosphatlösungen, viel weniger gut mit verdünntem Alkali allein; dieses Verhalten, das das Darmerepsin von dem pankreatischen zu unterscheiden scheint, wird nicht auf eine Verschiedenheit der Enzyme oder ihrer Assoziation mit Fremdstoffen, sondern auf den höheren Reinheitsgrad des Darmerepsins zurückzuführen sein, das bei der Reaktion z.B. von 0,02 n-NH_3 rascher Zerstörung unterliegt. In dem nachstehenden Versuch 10 ist die Elution eines Tonerdeadsorbates durch alkalisches Phosphat und durch verdünntes Ammoniak verglichen.

Versuch 10. 100 ccm Essigsäuremutterlauge (enth. 0,075 Er.-E.) adsorbierte man bei p_H = 4,7 mittels 7,0 ccm Tonerdesuspension C (= 52,5 mg Al_2O_3); in der Restlösung der Adsorption (104 ccm) waren noch 0,019 Er.-E. nachweisbar (2,00 ccm : 0,25 ccm 0,2 n-KOH [60 Min.]; k = 0,00037), d.i. 25 %.

Das in der Zentrifuge abgeschleuderte Adsorbat wurde zur Hälfte mit a) 50 ccm 0,02 n-NH_3 (20 % Glycerin enth.) b) 50 ccm 0,2 m-Phosphatpuffer von p_H = 8,2 (20 % Glycerin enth.) eluiert; die Elutionsausbeute entsprach a) 0,0075 (2,00 ccm : 0,29 ccm 0,2 n-KOH [60 Min.]; k = 0,0003), b) 0,0215 Er.-E. (2,00 ccm : 0,58 ccm 0,2 n-KOH [60 Min.]; k = 0,000861) oder 27 bzw. 77 % der adsorbierten Enzymmenge.

Die Anwendung der Tonerdeadsorption, so wie sie beschrieben wurde, bedeutet keine merkliche Konzentrationssteigerung des Enzyms; zwar gelingt es dabei, wie unten gezeigt werden wird, die tryptische Verunreinigung

der Enzymlösungen vollständig abzutrennen, den Erepsinwert der Elution findet man indessen, wohl infolge der unvermeidlichen Verluste, die insbesondere die Ausfällung der Phosphorsäure begleiten, nicht höher als vor der Adsorptionsvornahme.

Versuch 11. Enzymatische Konzentration in der Tonerdeelution. 50 ccm einer mittels Phosphat, wie in Versuch 10, bereiteten Elution aus Tonerdeadsorbat (enth. 0,0215 Er.-E.) befreite man durch Zusatz von 20,0 ccm n-Ammoniak-Ammonchloridgemisch von p_H = 9,2 + 21 ccm 0,4 m-Magnesiumacetat unter Eiskühlung und Filtration von der Phosphorsäure; in 90,5 ccm des phosphatfreien Filtrats waren noch 0,0141 Er.-E. enthalten (10,0 ccm: 1,35 ccm 0,2 n-KOH [60 Min.]; k = 0,00156), der Verlust belief sich also auf 34 %.

80 ccm der phosphatfreien Elution (mit 0,0125 Er.-E.) dialysierte man 7 Tage lang in einer sogen. Fischblase und unter Toluol gegen fliessendes, dest. Wasser; sie wiesen noch 0,0684 g Trockengewicht auf, entsprechend dem Erepsinweer 0,18.

b) Abtrennung von Trypsin. Die präparative und analytische Bedeutung der Adsorption mit Tonerde für die Beschreibung des Erepsins ist in der Abtrennung tryptischer Verunreinigungen zu sehen, die die rohen Lösungen des Enzyms, die man aus der Darmschleimhaut gewinnt, auch nach sorgfältiger Reinigung der Därme stets begleiten. Das Adsorptionsverhalten des Darmerepsins gegenüber Tonerde, das mit dem für pankreatisches Enzym beobachteten identisch gefunden wird, unterscheidet sich wie dieses von dem des Pankreastrypsins;

das tryptische Enzym wird nämlich bei saurer Reaktion von dem Adsorbens nicht oder nur wenig aufgenommen.[1] Es ist sehr bemerkenswert, dass das verschiedene Adsorptionsverhalten von Pankreaserepsin und Darmerepsin einerseits und von Pankreastrypsin andererseits unabhängig von der Natur der begleitenden Stoffe, in den rohen Auszügen der Pankreasdrüsen wie in denen der Darmschleimhaut, zur Geltung kommt; es ist also nicht auf den Einfluss begleitender Stoffe, sondern auf eine verschiedene chemische Orientierung der enzymatischen Individuen selbst zurückzuführen.

Die präparative Abtrennung des Trypsins, die für die Erkenntnis der spezifischen ereptischen Wirkungen von Bedeutung ist, beschreibe ich an nachstehendem Beispiel; für die Prüfung auf Trypsin ist nicht die der früher angegebenen Trypsinbestimmung zugrunde liegende Gelatine, sondern das noch leichter spaltbare Casein als Substrat gewählt worden.

2,00 ccm einer Mutterlauge des Essigsäurefällung enthielten zufolge der Bestimmung 0,0013 Er.-E. (0,89 ccm 0,2 n-KOH [60 Min.]).

4,00 ccm der Lösung wirkten bei p_H = 7,8 (eingestellt mit 0,2 m-Phosphatpuffer) 5 Stdn. bei 30° auf 5,0 ccm 3 %ige Caseinlösung ein; die gemessene Aciditätszunahme entsprach dann 0,67 ccm 0,2 n-KOH, die Lösung enthielt also eine geringe, aber deutlich messbare Menge Trypsin.

100 ccm der Lösung (0,065 Er.-E. enth.) adsorbierte man bei p_H = 4,7 mit 20,0 ccm Tonerdesuspension C$_\alpha$ (= 150 mg Al_2O_3) und eluierte das Adsorbat

---

1) Vgl. dazu E.WALDSCHMIDT-LEITZ u.A.HARTENECK, H.S., Bd.147, S.286 u.zwar S.304 (1925).

mittels 50 ccm 0,2 m-Phosphatpuffer von p_H = 8,2 (20 % Glycerin enth.).

In der gesamten Menge der Tonerdeelution fanden sich noch 0,0525 Er.-E. (2,00 ccm: 1,47 ccm 0,2 n-KOH [60 Min.]; k = 0,0042), d.i. 80 % der Ausgangslösung.

4,00 ccm der Elution ergaben nach 5-stündiger Einwirkung auf Casein keine messbare Aciditätszunahme, waren also frei von tryptischer Wirkung; 5,00 ccm der Adsorptionsmutterlauge bewirkten dagegen nach 5 Stunden einen Aciditätszuwachs entspr. 0,45 ccm 0,2 n-KOH, die Hauptmenge des Trypsins war also nicht adsorbiert.

c) Adsorption durch Kaolin. Durch das elektronegative Kaolin wird das Erepsin, wie schon Fr.E.RICE[1] angegeben hat, bei saurer Reaktion gut adsorbiert; auch gelingt seine Freilegung aus den Adsorbaten durch Einwirkung z.B. von alkalischem Phosphat in befriedigender Ausbeute. Aber auch die Adsorption durch Kaolin, die nicht näher untersucht wurde, scheint keine geeignete Handhabe zur Steigerung der enzymatischen Konzentration zu bieten, man findet den Erepsinwert in den Elutionen nur mässig erhöht.

Versuch 12. Reinheitsgrad der Kaolinelution. 50 ccm einer Essigsäuremutterlauge mit 0,0375 Er.-E. (2,00 ccm: 0,97 ccm 0,2 n-KOH [60 Min.]; k = 0,0015) adsorbierte man bei p_H = 4,7 (eingestellt durch Zusatz von 0,5 ccm n-Kaliumacetat) mit 25,0 ccm (= 1,938 g) einer Aufschlämmung von chinesischem Kaolin (mit Salzsäure ausgekocht, neutral reagierend) und eluierte das abzentrifugierte Adsorbat mit 50 ccm 0,2 m-Phosphatpuffer von p_H = 8,2 (20 % Glycerin enth.).

---

1) A.a.O.

Die Mutterlauge der Adsorption enthielt in 70 ccm noch 0,0075 Er.-E. (4,00 ccm: 0,36 ccm 0,2 n-KOH [60 Min.]; k = 0,00043), es waren also 80 % des Enzyms adsorbiert; der Enzymgehalt der Elution belief sich auf insgesamt 0,0235 Er.-E. (4,00 ccm: 1,39 ccm 0,2 n-KOH [60 Min.]; k = 0,00188), entspr. 78 % der adsorbierten Enzymmenge.

40,0 ccm der Elution (mit 0,0188 Er.-E.) befreite man durch 8-tägige Dialyse in einer sogen. Fischblase unter Toluol gegen fliessendes dest. Wasser vom Phosphate und von Glycerin; sie hinterliessen nach dem Abdampfen auf dem Wasserbade 0,0645 g Trockenrückstand; daraus berechnet sich der Erepsinwert 0,29.

III. Zur Spezifität des Erepsins.

1. Peptide.

Die Spaltbarkeit einer Reihe einfacher Peptide durch Darmerepsin prüfte man mit dem reinen, trypsinfreien Enzym. Es ist bekannt, dass dieses Enzym alle bisher geprüften einfachen Peptide natürlich vorkommender Aminosäuren zu hydrolysieren vermag; die Untersuchung ihrer Spaltbarkeit, die ich vorgenommen habe, besitzt daher nur insofern Bedeutung, als sie die Reihenfolge der Angreifbarkeit der angewandten Peptide durch Darmerepsin mit der für das reine pankreatische Erepsin beobachteten zu vergleichen gestattet. Man findet das Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeiten, mit denen die Hydrolyse der einzelnen Peptide verläuft, innerhalb der Fehlergrenzen konstant, wie aus der nachstehenden Tabelle 8 zu ersehen ist; die einzige Ab-

weichung, die die Tabelle in einem Falle für das Verhältnis der Hydrolysengeschwindigkeit von Glycylglycin durch die beiden Enzyme verzeichnet, dürfte auf einen Versuchsfehler zurückzuführen sein. Es ist vielmehr anzunehmen, dass auch die genauere Bestimmung der Affinitätsverhältnisse bei beiden Enzymen, nämlich unter Berücksichtigung der jeweiligen Konzentration der Enzym-Substratverbindung, ihre Identität bestätigen und vertiefen wird; damit würde eine exakte Grundlage gegeben sein für eine Identifizierung der für die Mengen der beiden Enzyme gewählten Masse, der Erepsineinheit (Er.-E.) und der Pankreaserepsineinheit (P.Er.-E.)[1], wie für die einwandfreie Feststellung ihrer relativen Konzentration in der Pankreasdrüse und in der Darmschleimhaut bzw. in deren Sekreten.

Das zu den in der Tabelle mitgeteilten Versuchen angewandte Verhältnis der Enzymmengen betrug, wie der Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten erkennen lässt, etwa 2 : 1; man liess 3,00 ccm Elution aus Tonerdeadsorbat, gewonnen aus Darmschleimhaut, bzw. 2,00 ccm Tonerdeelution, bereitet aus frischer Pankreasdrüse, 1 bzw. 2 Stunden bei 30° und p_H = 7,8 (eingestellt durch 5,00 ccm 0,2 m-Phosphatpuffer von p_H = 7,8 + 1,80 ccm 0,2 n-NaOH) auf 0,001 Mol des Peptids einwirken.

---

1) H.S., Bd.147, S.286 u.zwar S.295 (1925).

Tabelle 8.

Peptidhydrolyse durch Darm- und Pankreaserepsin.

Substrat	Darmerepsin		Pankreaserepsin		$k_1 : k_2$
	Aciditäts-zunahme ccm 0,2 n-KOH	k_1 (monomolek.) ber.	Aciditäts-zunahme ccm 0,2 n-KOH	k_1 (monomolek.) ber.	
Alanyl-glycin	2,48	0,0048	2,28	0,00222	2,2 ± 0,07
Leucyl-glycin	1,12	0,0018	1,07	0,00087	2,1 ± 0,13
Glycyl-tyrosin	0,41	0,00061	0,39	0,00030	2,0 ± 0,30
Glycyl—glycin	0,65	0,0010	0,15	0,00011	9,1
dgl.	0,84	0,00133	0,66	0,00051	2,6 ± 0,20
dgl.	0,90	0,00144	0,77	0,00061	2,4 ± 0,16
Leucyl-alanin	0,15	0,00021	0,12	0,00009	2,3 ± 1,0

2. Pepton, Proteine.

Zur Prüfung der Spaltbarkeit von käuflichem Pepton, sowie von einfacher gebauten basischen Proteinen, Protamin und Histon, und endlich einer Reihe höhermolekularer Eiweisskörper aus verschiedenen Klassen dieser Stoffe durch das proteolytisch einheitliche Darmerepsin ergab in keinem Falle eine die Fehlergrenzen übersteigende Aciditätszunahme; das intestinale Enzym stimmt also auch in dieser Beziehung mit dem pankreatischen überein.[1)]

Die Folgerungen, die sich aus der Resistenz beispielsweise von Pepton und Protamin ableiten lassen und die die bisherigen Anschauungen über die Struktur dieser Körper berichtigen, sind bereits

---

1) Vgl. E.WALDSCHMIDT-LEITZ u. A.HARTENECK, 3.Mitteilung. H.S., Bd.149, S.203 (1925).

im theoretischen Teil dieser Arbeit erörtert worden; in nachstehender Tabelle 9 stelle ich die experimentellen Ergebnisse zusammen.

Tabelle 9.

Hydrolyse von Pepton und Proteinen durch Darmerepsin. (Elution aus Tonerdeadsorbat; 30°; p_H = 7,8 , nur für Gliadin p_H = 6,6).

Angew.Substrat	Menge g	Angew. Er.-E.	Dauer Stdn.	Aciditäts-zunahme ccm 0,2 n-KOH
Pepton (ex album., Merck)	0,15	0,00130	2	0,06
Clupeinsulfat	0,10	0,00130	2	0,02
Thymushiston	0,10	0,00130	2	- 0,02
Casein	0,15	0,00420	6	0,05
Fibrin	0,20	0,00270	5	0,03
Gliadin	0,15	0,00320	7	0,00
Zein	0,15	0,00270	5	0,03
Eieralbumin	0,15	0,00270	5	- 0,02
Ricinusglobulin	0,15	0,00270	5	0,02

IV. Beständigkeit von Glycinanhydrid gegenüber proteolytischen Enzymen bei physiologischen Bedingungen.

Die enzymatische Spaltbarkeit des Diketopiperazins prüfte man unter den für die Enzymwirkung geeignetsten Bedingungen. Das angewandte Glycinanhydrid war frei von Peptid, das Präparat gab keine Reaktion mit Ninhydrin und zeigte in alkoholisch-wässriger Lösung keine Acidität.

Einwirkung von Pepsin:

10 ccm einer 1 %igen Lösung von Glycin-anhydrid überliess man mit 0,10 g Pepsin (1:4000) unter Zusatz von 2,00 ccm 1/3-mol.Citrat-Salzsäure-Puffer von p_H = 1,6. a) 24, b) 48 Stdn. bei 30°; danach entsprach der Zuwachs an Acidität a) 0,00 , b) 0,08 ccm 0,2 n-KOH und in den gleichzeitig ohne Enzymzusatz ausgeführten Kontrollen a) 0,00 und b) 0,10 ccm der Lauge; eine enzymatische Spaltung des Anhydrids war also nicht zu erkennen.

Einwirkung von Trypsin:

Auf 10 ccm 1 %ige Glycin-anhydridlösung liess man bei Gegenwart von 5,00 ccm 1/5 mol.Phosphat-Puffer von p_H = 7,8 und 30° 5,0 ccm einer durch Enterokinase aktivierten, gut wirksamen Enzymlösung aus getrockneter Pankreasdrüse von Schwein einwirken, die man zuvor einer weitgehenden Selbstverdauung überlassen hatte. Die gemessene Aciditätszunahme betrug nach a) 1, b) 2 Tagen a) 0,00 und b) 0,05 ccm und in den Kontrollen ohne Enzym a) 0,00 und b) 0,03 ccm 0,2 n-KOH.

Einwirkung von Darmerepsin:

Das angewandte Enzymmaterial war ein Glycerinauszug aus der Schleimhaut von Schweine-Dünndärmen und erwies sich als gut wirksam für die Hydrolyse von Dipeptiden (4,0 ccm der Lösung spalteten bei p_H = 7,8 und 30° in 1 Stunde 52,4 % von 0,132 g Glycil-glycin). 4,0 ccm der Enzymlösung wirkten bei 30° und p_H = 7,8 (eingestellt durch Zusatz von 5,00 ccm 1/5 mol. Phosphat-puffer von p_H = 7,8 + 0,20 ccm 0,2 n-NaOH) a) 1, b) 2 Tage lang auf 10,0 ccm 1 %ige Glycinanhydridlösung ein; die gemessene Aciditätszunahme betrug a) 0,00 , b) 0,04 und in den Kontrollen ohne Enzym a) 0,00 und b) 0,03 ccm 0,2 n-KOH.

Die mitgeteilten Beobachtungen bestätigen die Angaben von E.ABDERHALDEN und K.GOTO[1] über die Wirkung von Pepsin und Trypsin, und sie erweitern sie mit der Untersuchung des Darmerepsins; eine Zerlegung des Substrates durch die angewandten Enzyme liess sich in keinem Falle nachweisen.

---

1) Fermentforschung, Bd.7, S.169 (1923).

V. Beständigkeit von Glycinanhydrid bei physiologischem p_H.

Die Einwirkung von Säure und Alkali auf ein Diketopiperazin, das Glycyl-alaninanhydrid, ist zuerst von E.ABDERHALDEN und K.GOTO[1] eingehender untersucht worden; sie beobachteten dabei eine Aufspaltung des Ringes, rascher unter der Wirkung von Alkali, langsamer bei saurer Reaktion. In neuerer Zeit hat M.LÜDTKE[2] über ähnliche Ergebnisse bei mehreren anderen Anhydriden berichtet. Es ist gegen diese Befunde der Einwand zu erheben, dass sie die Einhaltung physiologischer Säure- bzw. Alkali-Konzentrationen nicht genügend berücksichtigen; dies gilt insbesondere von der von ABDERHALDEN und GOTO veröffentlichten Untersuchung deren Ergebnisse zu weitgehenden physiologischen Schlußfolgerungen Veranlassung gegeben haben. Prüft man das Verhalten eines Diketopiperazins, beispielsweise des Glycin-anhydrids, bei der normalen Reaktion tierischer Verdauungssäfte, also entweder bei der bekannten Acidität des Magensaftes oder bei dem p_H von Pankreas und Darmsekret, so ergibt sich eine viel grössere Beständigkeit; zwar beobachtet man eine allmähliche Hydrolyse zum Peptide, insbesondere unter der Wirkung von Alkali, allein ihr Ausmaß bleibt auch bei sehr langer Einwirkung unter der Grenze physiologischer Bedeutung. Die nachfolgende Tabelle veranschaulicht die erhaltenen Resultate; man ermittelte den Verseifungsgrad durch Titration in alkoholischer Lösung.

---

1) Fermentforschung, Bd.7, S.169 (1923).
2) H.S., Bd.141, S.100 (1924).

Tabelle 10.

Beständigkeit von Glycin-anhydrid.

(10,0 ccm 1 %ige Glycin-anhydridlösung; Nr.1-4: 2,00 ccm 1/3 mol. Citrat-Salzsäure-Puffer; Nr.5-7: 5,00 ccm 1/3 mol. Phosphatpuffer; Nr.8-10: 5,00 ccm n-Ammoniak-Ammonchlorid-puffer p_H = 8,4).

Nr.	Einwirkung Stdn.	p_H	Temperatur Grad	Aciditäts-zunahme ccm 0,2n-KOH	Gebildetes Peptid %
1	4	1,4	37	0,06	1,3
2	8	1,4	37	0,10	2,3
3	24	1,4	37	0,21	4,7
4	48	1,4	37	0,26	5,8
5	24	7,8	30	0,00	0
6	48	7,8	30	0,03	0,7
7	96	7,8	30	0,08	1,8
8	4	8,4	37	0,03	0,7
9	22	8,4	37	0,45	10,2
10	48	8,4	37	0,93	21,1

ÜBER DIE ENZYMATISCHE HYDROLYSE DES CLUPEINS.

Theoretischer Teil.

Für die Auflösung der Proteinstrukturen, die neuerdings viel diskutiert werden, wird es von wesentlicher Bedeutung sein, wenn es gelingt, ihren hydrolytischen Abbau an möglichst zahlreichen, aber definierten Zwischenstufen festzuhalten und die Zusammensetzung der jeweiligen Reaktionsprodukte zu ermitteln. Die bisher angewandten enzymatischen oder nichtenzymatischen Verfahren der Hydrolyse haben dieses Ziel nicht erreicht. Die Trennung der pankreatischen Proteasen, des Trypsins und Erepsins, die E.WALDSCHMIDT-LEITZ und A.HARTENECK[1] beschrieben haben, und die Erkenntnis ihrer spezifischen Wirkungen wie auch der besonderen Funktionen des nichtaktivierten Trypsins hat nun zu dieser Aufgabe neue Wege ermittelt; die Erwartung war ausgesprochen, „dass die fraktionierte enzymatische Hydrolyse einfacher Proteine, z.B. durch das einheitliche Trypsin oder Erepsin zu definierteren und gleichartigeren Reaktionsprodukten führen würde, als sie bisher erhalten wurden".[2]

Die Gruppe der Protamine, deren Zusammensetzung in den bahnbrechenden Untersuchungen von A.KOSSEL und seinen Schülern weitgehende Aufklärung erfahren hat, erscheint für die enzymatische Fraktionierung und für

---

1) H.S., Bd.147, S.286 u.zwar S.301 (1925).
2) E.WALDSCHMIDT-LEITZ u. A.HARTENECK, H.S., Bd.149, S.203 u.zwar S.214 (1925).

die Isolierung und Beschreibung spezifischer Reaktionsprodukte in besonderem Maße geeignet; neben einer einfachen und gleichartigen Zusammensetzung, die durch eine verhältnismässig geringe Anzahl von Bausteinen, den überwiegenden Arginingehalt einerseits, die Beteiligung nur weniger Monoaminosäuren anderseits gekennzeichnet ist, sind diese Körper durch ein besonderes Verhalten gegenüber enzymatischem Angriff ausgezeichnet, das in einer Unangreifbarkeit durch Pepsin auf der einen Seite, zum andern in ihrer Spaltbarkeit schon durch das nichtaktivierte Trypsin[1] zum Ausdruck kommt. Die Vorstellung eines einfacheren strukturellen Aufbaus der Protamine, auf die diese Tatsachen hinzuweisen scheinen, hat ja auch die bemerkenswerte, von A.KOSSEL[2] ausgesprochene Ansicht gestützt, derzufolge ein protaminartiger Kern als wesentlicher Bestandteil alle übrigen Proteine angenommen wurde. Der einfache und gleichartige Bau der Protamine ergibt sich nach KOSSEL aus dem übereinstimmenden Verhältnis ihres Gehaltes an Diaminosäuren und Monoaminosäuren wie 2:1, entsprechend ihrem überwiegend basischen Charakter. Zwar hat als der bestbekannte Vertreter dieser Klasse das Salmin, das Protamin aus dem Sperma des Lachses, zu gelten, an dessen Aufbau nach A.KOSSEL und H.D.DAKIN[3] neben Arginin nur drei Monoaminosäuren teilhaben; aber auch die Zusammensetzung des Clupeins aus Hering, dessen Hydrolyse ich beschreibe, scheint davon nicht weitgehend abzuweichen, die Analyse seiner Spaltprodukte ergibt nämlich

---

1) E.WALDSCHMIDT-LEITZ u.A.HARTENECK, H.S., Bd.149, S.203 u.zwar S.207 (1925).

2) Chem.Ber., Bd.34, S.3215 u.zwar S.3235 (1901).

3) H.S., Bd.41, S.407 u.zwar S.412 (1904).

nach KOSSEL und DAKIN[1] eine Zusammensetzung im Verhältnis von 16 Mol.Arginin: 4 Mol. Prolin: 2 Mol. Valin: 1 Mol. Serin: 1. Mol. Alanin, wenn auch die relative Beteiligung der angeführten Monoaminosäuren für die Beurteilung der geringsten möglichen Molekulargrösse maßgebend, an diesem Beispiel noch weniger sicher ermittelt zu sein scheint.

Die Versuche der Literatur zur partiellen Hydrolyse der Protamine sind unbefriedigend geblieben. So hat die Aufspaltung des Moleküls durch Einwirkung verdünnter Säure, die zur Bildung der sogen. Protone führt, bisher in keinem Falle eine sichere Kennzeichnung der Reaktionsprodukte erlaubt. Auch bei den Versuchen zur enzymatischen Hydrolyse der Protamine, über die M.TAKEMURA[2] und F.ROGOZINSKI[3] berichten, sind keine Zwischenstufen des hydrolytischen Abbaus beobachtet worden; die angewandten Enzympräparate waren nicht enzymatisch einheitlich. Wenn beispielsweise ROGOZINSKI eine durchgreifende Hydrolyse des Clupeins durch Pankreatinpräparate beschreibt, so ist diese Erscheinung auf die Tatsache zurückzuführen, dass das verwendete Enzymmaterial aus einem Gemisch von aktiviertem Trypsin und von Erepsin bestand, deren Einzelwirkungen nicht unterschieden werden konnten. Die Beobachtung von A.KOSSEL und A.MATTHEWS[4] über die Bildung eines Tripeptids bei der Hydrolyse des Störprotamins Sturin durch Trypsinlösungen ist vereinzelt geblieben; die mangelnde Kennt-

---

1) a.a.O., S.3 u.zwar S.414 (1904).
2) H.S., Bd.63, S.201 (1909).
3) H.S., Bd.79, S.398 (1912).
4) H.S., Bd.125,S.190 (1898).

nis von der Zusammensetzung der angewandten Enzymlösung mag ihre Bestätigung und Erweiterung erschwert haben.

Es bedurfte neuer, mehr auswählender Methoden der Hydrolyse, um den Abbau der Protamine in bestimmte und charakteristische Teilvorgänge zu zerlegen. Sie ergeben sich aus der Anwendung einheitlicher proteolytischer Enzyme, so von Trypsin und Erepsin, zur fraktionierten enzymatischen Hydrolyse. Das Verfahren zur Trennung der Pankreasproteasen, das E.WALDSCHMIDT-LEITZ und A.HARTENECK[1] mitgeteilt haben und das noch empfindlicher gestaltet wird, hat eine Erweiterung erfahren in der Richtung, die Darstellung von Lösungen des nichtaktivierten Trypsins zu verbessern, nämlich an die Trennung von pankreatischem Erepsin die Abtrennung der letzten Anteile begleitenden, spontan aktivierten Trypsins anzuschliessen, also die Zerlegung des partiell aktivierten Enzyms in seine nichtaktivierte und in seine aktivierte Komponente. Die spezifische Wirkungsweise dieser beiden enzymatischen Individuen, beispielsweise bei der Einwirkung auf Clupein, die sie streng voneinander zu unterscheiden erlaubt, rechtfertigt die Einführung einer neuen und unterschiedlichen Nomenklatur; wenn in diesen Ausführungen die Bezeichnung „Trypsin" ausschliesslich für das nichtaktivierte Enzym und für das mit Enterokinase aktivierte die Benennung „Trypsin-Kinase" angewendet wird, so entspricht diese Unterscheidung auch der schon früher[2]

---

1) H.S., Bd.147, S.286 u.zwar S.301 (1925).
2) E.WALDSCHMIDT-LEITZ, H.S., Bd.132, S.181 u.zwar S.190 (1923/24);
E.WALDSCHMIDT-LEITZ u.A.HARTENECK, H.S., Bd.149, S.203 u.zwar S.207 (1925).

entwickelten und sichergestellten Vorstellung über die Bedeutung der Enterokinase als eines Hilfsstoffs für die Auslösung bestimmter enzymatischer Funktionen; sie findet ihr Gegenstück in dem einfacheren Beispiel der Gegenüberstellung von Papain mit seiner Blausäureverbindung, auf deren besondere Wirkungen zuerst R.WILLSTÄTTER und W.GRASSMANN[1] hingewiesen haben.

Die fraktionierte Hydrolyse des Clupeins durch die drei einheitlichen Proteasen, Trypsin, Trypsin-Kinase und Erepsin, die ich mit Kombinationen von wechselnder Reihenfolge vorgenommen habe und deren Ergebnisse ich nachstehend in Tabelle 1 zusammenstellte, vermittelt ein neuartiges und charakteristisches Bild ihres spezifischen Wirkungsbereiches und sie verspricht bedeutsame Einblicke in den Aufbau des Moleküls. Die gemeinsame Bedeutung der Versuche beruht auf der Tatsache, dass die Wirkung der einzelnen Enzyme nach einer jeweils bestimmten Leistung zum Stillstande kommt und dass diese Leistungen, durch die Bildung chemisch fassbarer Gruppen gekennzeichnet, in einfachen ganzzahligen Verhältnissen zueinander stehen.

---

1) H.S., Bd. 138, S.184 u.zwar S.204 (1924).

Tabelle 1.

Hydrolyse durch Trypsin, Trypsin-Kinase, Erepsin; Reihenfolge und Leistung.

(Hydrolyse von 0,20 g Clupeinsulfat = 0,142 g wasser- und aschefreies Clupein; Leistungseinheit angenommen entspr. 0,90 ccm 0,2 n-COOH.)

Vers. Nr.	Reihenfolge der Enyzme	Zuwachs (ccm 0,2 n) COOH	Zuwachs (ccm 0,2 n) NH_2	Leistung	Leistungsverhältnis
1	Trypsin . . .	0,90	0,90	1,0 ± 0,03	1
	Trypsin-Kinase	2,67	2,36	3,0 ± 0,04	3
	Darmerepsin .	0,94	0,96	1,0 ± 0,05	1
	Summe	4,51	4,22	5,0	
2	Trypsin . . .	0,92	0,92	1,0 ± 0,03	1
	Darmerepsin .	0,93	0,98	1,0 ± 0,03	1
	Trypsin-Kinase	0,89	0,83	1,0 ± 0,04	1
	Darmerepsin .	1,70	1,58	1,9 ± 0,07	2
	Summe	4,44	4,31	4,9	
3	Trypsin-Kinase	3,13	3,15	3,5 ± 0,03	2
	Darmerepsin .	1,53	1,72	1,7 ± 0,04	1
	Summe	4,66	4,87	5,2	
4	Trypsin . . .	0,92	0,96	1,0 ± 0,03	
	Heferepsin .	0,08	0,12	0	

Die Analyse der Tabelle ergibt für den Aufbau des Clupeins, dass unter dem enzymatisch lösbaren Bindungen seines Moleküls Gruppen zu unterscheiden sind, die sich mit Bruchteilen von Fünfteln und Dritteln des hydrolytischen Gesamtvorgangs beteiligen; der Vergleich

der enzymatischenLeistungen in den Versuchen 1 und 2 veranschaulicht die Teilung der spaltbaren Bindungen nach fünf, Versuch 3 ihre Teilung nach drei Untergruppen, deren Kombination zu Schlussfolgerungen über die Gliederung des Moleküls dienen mag. Aus der Tatsache, dass der Wirkungsbereich der einzelnen Enzyme, zwar mit ihrer Reihenfolge wechselnd, aber stets in einfachen ganzzahligen Verhältnissen sich ausdrückt, ergibt sich die Feststellung, dass das untersuchte Protamin als einheitlicher chemischer Körper anzusehen ist, wenn nicht als ein Gemisch einzelner, in ihrem enzychemischen Verhalten gleichartiger Komponenten.

Bemerkenswerte und neuartige Aussagen erlaubt die Tabelle hinsichtlich der spezifischen Funktionen der einzelnen enzymatischen Individuen. Die Feststellung zwar, dass das Trypsin, das nichtaktivierte Enzym, in Bestätigung der Angaben von E.WALDSCHMIDT-LEITZ und A.HARTENECK[1] die Anspaltung des Clupeinmoleküls vollzieht und dass seine Funktion nach dem Zutritt der Enterokinase eine beträchtliche Erweiterung erfährt, war zu erwarten; die Beobachtung aber ist überraschend, dass die hydrolytische Leistung des vollaktivierten Enzyms „Trypsin-Kinase" am Clupein, wie der Vergleich der Versuche 1 und 3 erkennen lässt, in ihrem Ausmaße hinter der Anzahl der bei kombinierter Einwirkung von Trypsin und Trypsin-Kinase lösbaren Bindungen zurückbleibt. Die funktionelle Ungleichwertigkeit der Systeme Trypsin + Trypsin-Kinase einerseits und Trypsin-Kinase anderseits, die sich hieraus ergibt[2], besagt

---

1) H.S., Bd.149, S.203 u.zwar S.207 (1925).
2) Vgl. hierzu die entsprechenden Ausführungen von R.WILLSTÄTTER u.W.GRASSMANN, Über die Systeme Papain und Papain-Blausäure, H.S., Bd.138, S.184 u.zwar S.193 (1924).

also, dass die Dissoziation des Systems Trypsin-Kinase, die beispielsweise die adsorbierte Trennung seiner Komponenten ermöglicht[1], nicht ausreicht, um der spezifischen Funktion des Trypsins neben der seiner Aktivatorverbindung Geltung zu verschaffen. Eine weitere Beziehung wird durch den Vergleich der Versuche 1 und 3 erkennbar: die hydrolytische Wirkung des Trypsins, die man an Clupein beobachtet, addiert sich bei der alleinigen Aufspaltung des Moleküls durch Trypsin-Kinase und Darmerepsin zu ähnlichen Anteilen zu der Wirkung dieser beiden Enzyme; es wäre zu prüfen, ob es gelingt, durch eine noch stärkere Zurückdrängung der Dissoziation im System Trypsin-Kinase, nämlich durch eine Steigerung des Kinaseüberschusses, den auf die Erepsinwirkung entfallenden Anteil noch zu erhöhen.

Wenn die Zuteilung der spezifischen Funktionen des Trypsins zur Wirkung anderer Enzyme, nämlich Trypsin-Kinase und Erepsin, durch diese Beispiele belegt wird, so ist es auf der andern Seite gelungen, den grösseren Wirkungsbereich des Systems Trypsin-Kinase, nämlich seine Leistung an zweiter Stelle nach derjenigen des Trypsins (Versuch 1), mit drei Fünfteln des hydrolytischen Gesamtvorgangs, durch eine Veränderung in der Reihenfolge der angewandten Enzyme weiter zu zerlegen; durch die vorausgehende Einwirkung von Darmerepsin, die Versuch 2 wiedergibt, wird nämlich erreicht, dass die gesamte, für Trypsin-Kinase noch gemessene Leistung sich auf ein Fünftel beschränkt, während die restlichen Anteile der tryptischen Leistung, zwei Fünftel der Gesamthydrolyse, nunmehr sich der ereptischen Wirkung hinzugesellen.

---

1) E.WALDSCHMIDT-LEITZ, H.S., Bd.132, S.181 u.zwar S.235 (1923/24).

Diese Beziehungen lassen erkennen, dass die drei untersuchten Enzyme, Trypsin, Trypsin-Kinase und Erepsin, sich in ihren Wirkungen, soweit diese sich auf die Auflösung bestimmter chemischer Bindungen im Laufe der Gesamthydrolyse beziehen, gegenseitig in gewissem Umfange vertreten können, wenngleich man den Wirkungsbereich eines jeden von ihnen scharf abgegrenzt findet. Die Auffassung erscheint erschüttert, „dass für eine gegenseitige Vertretbarkeit" der Proteasen „..... keine Anhaltspunkte vorliegen und dass daher ihr Angriff auf spezifische Strukturen zu beziehen sein wird".[1] Aber es ist nur ihr Sinn ein anderer geworden. Aus den nun vorliegenden Ergebnissen ist zu folgern, dass die spezifische Einstellung der einzelnen Proteasen sich nicht auf die Aufspaltung verschiedener chemischer Bindungen allein bezieht; der spezifische Wirkungsbereich der untersuchten Enzyme stimmt zudem, wie eine einfache Betrachtung ergibt, mit den Leistungen nicht überein, die zu erwarten wären, wenn man die Spezifitätsunterschiede der Enzyme ausschliesslich auf Unterschiede in der Natur der an den Peptidbindungen beteiligten Aminosäuren zurückführt. Für die spezifische Angreifbarkeit der einzelnen chemischen Bindung im Molekül durch eine der Proteasen scheint vielmehr ausserdem die Natur oder die Anzahl der benachbarten Aminosäure- oder Peptidkomplexe ausschlaggebend zu sein. Für die Hydrolyse einer Anzahl einfacher Peptide, die nur durch Erepsin zerlegt werden, ist ein charakteristischer Unterschied in der Spezifität des Trypsins und des Erepsins erwiesen;[2]

---

1) E.WALDSCHMIDT-LEITZ u.A.HARTENECK, H.S., Bd.149, S.203 u.zwar S.213 (1925).

2) E.WALDSCHMIDT-LEITZ u.A.HARTENECK, H.S., Bd.149, S.204 u.zwar S.206 (1925).

es wird an umfangreicherem, synthetischem und hydrolytischem Material zu untersuchen sein, welche Faktoren die Spezifität der drei Enzyme, Erepsin, Trypsin und Trypsin-Kinase, beeinflussen und wo sich ihre Wirkungen überdecken. Es mag in diesem Zusammenhange der Hinweis von Interesse sein, dass Unterschiede in der spezifischen Angriffsweise, wenn auch nur Geschwindigkeitsunterschiede, schon für die Hydrolyse niedriger Peptide durch Erepsin verschiedener Herkunft, aus Hefe und aus Darm, von E.ABDERHALDEN und A.H.KOELKER[1] beschrieben worden sind. Zu diesen Unterschieden in der Spezifität der beiden Peptidasen fügt diese Untersuchung ein weiteres, besonders charakteristisches Beispiel: die durch erschöpfende Einwirkung des Trypsins gewonnenen Spaltprodukte aus Clupein, die durch das Darmerepsin rasch und in charakteristischem Ausmaße zerlegt werden, erweisen sich, wie aus Versuch 4 der Tabelle 1 ersichtlich, gegenüber dem Hefeenzym als beständig. Es ist bemerkenswert, dass in diesem Beispiel die spezifische Einstellung der beiden Peptidasen strenger hervortritt als die funktionellen Unterschiede, die zwischen Darmerepsin und Trypsin-Kinase beobachtet werden (vgl. die Versuche 1 und 2 der Tabelle 1).

Die Einschaltung eines weiteren einheitlichen proteolytischen Enzyms, des Papains aus dem Milchsafte des Melonenbaums[2], und zwar in einer Form seiner Blausäureverbindung, in den Gang der hydrolytischen Fraktionierung des Clupeins hat die gewonnenen Erkenntnisse über die Gliederung des Moleküls

---

1) H.S., Bd.54, S.363 (1907); Bd.55, S.417 (1908).

2) Vgl.dazu R.WILLSTÄTTER, W.GRASSMANN u.O.AMBROS, H.S., Bd.152, S.164 u.zwar S.166 (1925/26).

zu erweitern und zu vertiefen erlaubt. Es hat sich ergeben, dass die hydrolytische Leistung auch dieses Enzyms, ebenso wie die des Trypsins, ein Fünftel des gesamten enyzmatischen Abbaus beträgt, sei es bei der Einwirkung auf das ursprüngliche Protamin, sei es nach vorausgegangener Hydrolyse durch Trypsin. Wenn also die Wirkung der beiden Enzyme, von Papain-Blausäure und von Trypsin, auf Clupein unabhängig von der Reihenfolge ihrer Einwirkung beobachtet wird, also nicht identisch ist, so zeigt sie doch verwandte Züge; wie aus der Bestimmung des auf Aminosäuren und des auf Peptide entfallenden Anteils am Carboxylzuwachs, die wir im experimentellen Teil der Abhandlung beschreiben, hervorgeht, besteht die Wirkung der beiden Enzyme hier ausschliesslich in der Freilegung von Peptiden, also in der Zerlegung des Moleküls in grössere Bruchstücke; sie unterscheidet sich damit scharf von der Wirkungsweise der beiden anderen geprüften Proteasen, von Trypsin-Kinase und Erepsin, die in der Bildung beträchtlicher Mengen freier Aminosäuren zum Ausdruck kommt. Dieser Umstand in den Wirkungen von Trypsin einerseits und seiner Enterokinaseverbindung andererseits ist hervorzuheben; er mag für die Erkenntnis des spezifischen funktionellen Einflusses der Enterokinase Bedeutung erlangen.

Ich veranschauliche die Ergebnisse dieser Versuche, die die Einschaltung von Papain-Blausäure in den Hydrolysengang betreffen, in der nachstehenden Tabelle 2.

Tabelle 2.

Hydrolyse durch Trypsin, Trypsin-Kinase, Erepsin und Papain-Blausäure; Reihenfolge und Leistung.

(Hydrolyse von 0,20 g Clupeinsulfat = 0,142 g wasser- und aschefreies Clupein, Leistungsfähigkeit angenommen entspr. 0,90 ccm 0,2 n-COOH.)

Vers. Nr.	Reihenfolge der Enzyme	Zuwachs (ccm 0,2 n)		Leistung
		COOH	NH_2	
1	Trypsin	0,92	0,96	1,0 ± 0,03
	Papain-Blausäure . .	0,90	-	1,0 ± 0,04
	Trypsin-Kinase . . .	1,10	1,25	1,2 ± 0,05
	Darmerepsin	1,74	1,76	1,9 ± 0,07
	Summe:	4,67	-	5,1
2	Trypsin	0,92	0,96	1,0 ± 0,03
	Papain-Blausäure . .	0,87	0,94	1,0 ± 0,04
	Darmerepsin	1,36	1,20	1,5 ± 0,06
	Trypsin-Kinase . . .	0,75	0,65	0,8 ± 0,06
	Darmerepsin	0,54	-	0,6 ± 0,06
	Summe:	4,44	-	4,9
3	Papain-Blausäure . .	0,94	0,85	1,0 ± 0,03
	Trypsin	0,81	0,94	0,9 ± 0,04
	Trypsin-Kinase . . .	1,68	1,68	1,8 ± 0,04
	Darmerepsin	1,15	1,11	1,3 ± 0,06
	Summe:	4,58	4,58	5,0
4	Papain-Blausäure . .	0,92	1,00	1,0 ± 0,03
	Darmerepsin	2,18	2,24	2,4 ± 0,06

Trotz der ihrem Ausmaße nach übereinstimmenden hydrolytischen Leistungen von Papain-Blausäure und Trypsin, die die Tabelle belegt (Versuch 1 - 3) und die man unabhängig voneinander findet, führt die kombinierte Einwirkung der beiden Enzyme bei veränderter Reihenfolge nicht zu identischen Produkten; diese Feststellung ergibt sich aus dem veränderten Bereiche, den man für die darauffolgenden Leistungen von Trypsin-Kinase und Erepsin beobachtet; eine Vertauschung in der Reihenfolge der Einwirkung von Trypsin und Papain-Blausäure bewirkt, wie der Vergleich der Versuche 1 und 3 der Tabelle lehrt, zugleich eine Vertauschung der auf die Wirkung von Trypsin-Kinase und von Erepsin entfallenden Carboxylanteile. Die vorliegenden Beobachtungen erlauben noch keine Stellungnahme zu dieser Erscheinung. Kennzeichnend ist indessen, dass mit der Einschaltung der pflanzlichen Enzyme die ohne seine Mitwirkung beschriebenen ganzzahligen Verhältnisse für den Wirkungsbereich von Trypsin-Kinase und Erepsin (vgl.Tab. 1, Vers. 1) nun nicht mehr beobachtet werden. Es hat den Anschein, dass die Einwirkung von Papain-Blausäure das Molekül in ungleichartigere Bruchstücke zerlegt als etwa die von Trypsin, und es steht damit in Einklang, wenn die Versuche der Tabelle 2 übereinstimmend erkennen lassen, dass die Mitwirkung des Papains ein Anwachsen der durch Erepsin und eine Abnahme der durch Trypsin-Kinase zerlegbaren Produkte zur Folge hat (vgl.dazu die Versuche der Tabelle 1).

Von der grossen Anzahl besonderer Aussagen, die die Tabellen hinsichtlich der spezifischen Funktionen der einzelnen Enzyme zu gewinnen erlauben, heben sich

einige Feststellungen von allgemeinerer Bedeutung ab, die sich aus den vorliegenden Beobachtungen für den Aufbau des Clupeins ergeben. So lässt der Vergleich der auf den einzelnen Stufen der Hydrolyse freigelegten Mengen der Carboxyl- und der Aminogruppen, bestimmt nach dem Verfahren von van SLYKE, wie die Tabellen belegen, keine deutlichen Unterschiede erkennen; der Gesamtbetrag der gebildeten sauren und basischen Gruppen ist in jedem der angeführten Versuche identisch, er entspricht nämlich einem durchschnittlichen Werte von 4,53 ccm 0,2 n-Lösung für die Carboxyl- und 4,48 ccm 0,2 n-Lösung für die Aminogruppen. Es ist für die Beurteilung der Vollständigkeit der Hydrolyse wie der Einheitlichkeit des untersuchten Protamins von Bedeutung, dass der gefundene Gesamtzuwachs reaktionsfähiger α-Aminogruppen mit dem von F.ROGOZINSKI[1] nach vollständiger Hydrolyse mit Säure ermittelten nahezu übereinstimmt; er beträgt nämlich, wenn man ihn in Anteilen des Gesamtstickstoffs ausdrückt, 28,8 % in meinen Versuchen gegenüber 27,0 % nach ROGOZINSKI.[2] Wenngleich also die enzymatische Hydrolyse, die mit wechselnder Reihenfolge der einwirkenden Enzyme beschrieben wird und die in allen Beispielen zu dem nämlichen Endzustande führt, nur die Auflösung von Peptidbindungen betrifft und wenngleich sie die sämtlichen im Clupeinmolekül gebundenen α-ständigen Aminogruppen freizulegen erlaubt, so ist sie doch unvollständig, sofern man sie nach der Anzahl der freilegbaren Carboxyle bemisst. Es ergibt sich aus meinen Versuchen, dass der bei der Hydro-

---

1) H.S., Bd.79 u, zwar S.404 (1912).

2) Aus der von A.KOSSEL und H.D.DAKIN (a.a.O.) ermittelten Zusammensetzung des Clupeins errechnet sich der Wert 27,9 %.

lyse von 1 g trockenen, asche- und schwefelsäurefreien Clupeins ermittelte Aciditätszuwachs entspr. 6,38 ccm n-Lauge, vermehrt um die im Protamin selbst gemessene Acidität entspr. 0,35 ccm n-Lösung, einem Äquivalentgewichte von 148 entspricht; er ist also geringer als der nach der Zusammensetzung des Clupeins für die Summe aller freilegbaren Aminosäuren berechnete von 7,35 ccm n-Lösung, aus dem sich ein basisches Äquivalent von 135 ergibt. Die Annahme liegt nahe, dass der beobachtete Fehlbetrag in der Freilegung saurer Gruppen, der auf eine Unvollständigkeit der Hydrolyse hinweist, mit der Existenz enzymatisch nicht spaltbarer Peptide zu erklären ist. Für ihren Aufbau dürfte tertiär an Carboxyl gebundenes Prolin charakteristisch sein; aus der Äquivalenz des Zuwachses an Carboxyl- und an α-ständigen Aminogruppen, die ich beobachtete, ist nämlich zu folgern, dass die NH-Gruppe des Prolins, nach dem Verfahren von van SLYKE nicht bestimmbar, bei der enzymatischen Hydrolyse nicht freigelegt wird. Aber sie liegt auch im Clupein selbst nicht frei. Das haben schon A.KOSSEL und M.GAWBILOW[1]) aus der Tatsache geschlossen, dass das Clupein keine formoltitrierbaren Gruppen enthält, und die Geringfügigkeit der von mir bei der alkoholischen Titration gemessenen Acidität führt zu der nämlichen Schlussfolgerung. Die Konstanz des Verhältnisses im Zuwachse saurer und basischer Gruppen beim Abbau des Clupeins erbringt noch eine andere wichtige Bestätigung zu den Anschauungen A.KOSSELs über die Struktur der Protamine; sie lässt nämlich erkennen, dass die Guanidingruppe des Arginins, die mit salpetriger Säure gleichfalls nicht reagiert, an den Peptidbindungen des Moleküls nicht beteiligt ist.

---

1) H.S., Bd.81, S.274 (1912).

Es ist hervorzuheben, dass der gesamte Prozess der hydrolytischen Aufspaltung des Clupeins, dessen einzelne Stufen einfache quantitative Beziehungen aufweisen, in der Lösung von Peptidbindungen besteht. Die Annahme von N.TROENSEGAARD[1], es finde bei der Proteolyse eine sekundäre Bildung von Aminosäuren statt, ist für den Fall der Protamine auszuschliessen. Auch die Vorstellung, als sei der Abbau der Proteine in wesentlichen Teilen ein Vorgang der Desaggregation, zu deren Auslösung es spezifischer Enzyme bedürfe[2], ist nicht mehr aufrecht zu erhalten; wenn Desaggregationsvorgänge an der Hydrolyse der Proteine teilhaben, so sind dies nur Nebenerscheinungen der Aufspaltung von Säureamidbindungen. Die Anschauungen endlich, die einen Aufbau der Proteine aus einfachen[3] oder polymeren[4] Diketopiperazinen diskutieren, finden in der beobachteten Gliederung des Moleküls, in welchem Untergruppen zu Fünfteln und zu Dritteln unterschieden werden, und in der spezifischen Einstellung der einzelnen Enzyme auf diese keine Stütze. Spezielle Vorstellungen vom Aufbau des Clupeinmoleküls, die sich aus vorliegenden Befunden sehr wohl schon ableiten liessen, zu entwickeln, wäre verfrüht. Es wird der Beschreibung der spezifischen Reaktionsprodukte auf den einzelnen Zwischenstufen der Aufspaltung und der erweiterten Anwendung der neuen Methoden auf andere Proteine vorbehalten sein, bestimmte und gesicherte strukturelle Erkenntnisse zu begründen.

---

1) Zs.für angew.Chem., Bd.38, S.623 (1925).
2) Vgl. C.OPPENHEIMER, "Die Fermente und ihre Wirkungen", 5.Aufl. Leipzig 1925; Bd.2, S.811 ff. und S.1208; H.PRINGSHEIM, Naturw., Bd,13, S.1084 u. zwar S.1087 (1925).
3) E.ABDERHALDEN, Naturw., Bd.12, S.716 (1924).
4) M.BERGMANN, A.MIEKELY u.E.KANN, Liebigs Ann.d. Chem., Bd.445, S.17 (1925).

Experimenteller Teil.

I. Zur Darstellung des Ausgangsmaterials.

1. Clupeinsulfat.

Zur Gewinnung des Protamins, zu der man etwa 1600 g getrocknetes Heringssperma verarbeitete, verfuhr man nach den Angaben von A.KOSSEL und O.SCHMIEDEBERG[1]; die Ausbeute an reinem, farblosem, aber noch wasserhaltigem Sulfat belief sich auf insgesamt 217 g.

5,0000 g lufttrockenes Sulfat gaben, bei 110° zur Konstanz getrocknet, 0,4264 g Wasser ab, entsprechend einem Wassergehalte von 8,52 %; die getrocknete Substanz erwies sich als stark hygroskopisch.

Analysen. Das zur Konstanz getrocknete Präparat enthielt 2,37 % Asche, 23,56 % Stickstoff, sowie 20,25 % Schwefelsäure.

0,5513 g ergaben 0,0138 g Asche.

0,3251 g lieferten bei der Bestimmung nach KJELDAHL 54,65 ccm 0,1 n-NH_3.

0,3820 g ergaben 0,1846 g $BaSO_4$.

0,4903 g getrocknetes Sulfat, in 10,0 ccm H_2O gelöst, verbrauchten nach dem Zusatz von 90 ccm abs. Alkohol 0,65 ccm 0,2 n-KOH; hieraus errechnet sich für 1,00 g asche- und schwefelsäurefreie Substanz eine Acidität entspr. 0,35 ccm n-Lauge.

0,2744 g getrocknetes Sulfat, in 5,0 ccm H_2O gelöst, ergaben, nach van SLYKE bestimmt, 1,00 ccm Stickstoff (reduz.), entspr. 0,22 ccm 0,2 n-NH_2; für 1,00 g asche- und schwefelsäurefreies Clupein ergibt sich damit ein Gehalt entspr. 0,20 ccm n-NH_2.

---

1) Vgl. K.THOMAS in H.THIERFELDERs Handbuch der physiologisch-chemischen und pathologisch-chemischen Analyse, 9.Aufl., Berlin 1924, S.475.

Die optische Aktivität des Präparates entsprach den Angaben der Literatur; aus der für eine 0,5 %ige Lösung des lufttrockenen Sulfats bei zwei dm Rohrlänge und 20° beobachteten Drehung von - 0,77° errechnet sich für die wasserfreie Substanz α_D = - 84°, während A.KOSSEL[1] die spezifische Drehung zu - 83,1°, D.KURAJEFF[2] zu - 85,5° bestimmte.

2. Zur Trennung von Trypsin und Erepsin.

Das Verfahren zur Trennung der pankreatischen Proteasen durch Tonerdeadsorption, das E.WALDSCHMIDT-LEITZ und A.HARTENECK[3] an einer Reihe von Beispielen beschrieben haben, wurde nun empfindlicher gestaltet und ergänzt, insbesondere mit der Angabe der dafür besonders tauglichen, aber" vordem noch nicht hinreichend charakterisierbaren Tonerdesorten".[4] Die Erscheinung, dass „verschiedene Proben von Tonerde der Sorte C[5] ein quantitativ stark abweichendes Verhalten bei der Adsorption des Trypsins zeigten", ist nun ihren Ursachen nach erkannt. Aus einer Untersuchung von R.WILLSTÄTTER, H.KRAUT und O.ERBACHER[6] war nämlich hervorgegangen, dass das frisch bereitete Aluminiumhydroxyd der Formel $Al(OH)_3$ (Sorte C) bei der Aufbewahrung in wässriger Suspension eine Umwandlung erfährt, die auch sein chemisches Verhalten verändert, einen Übergang aus der ur-

---

1) H.S., Bd.25, S.165 (1898).

2) H.S., Bd.26, S.524 (1899).

3) H.S., Bd.147, S.286 u.zwar S.303;
Bd.149, S.203 u.zwar S.214 (1925).

4) H.S., Bd.149, S.1, a.a.O.

5) R.WILLSTÄTTER u.H.KRAUT, Chem.Ber., Bd.56, S.1117 (1923), R.WILLSTÄTTER, H.KRAUT u.O.ERBACHER, Chem. Ber., Bd.58, S.2448 u.zwar S.2455 (1925).

6) Chem.Ber., Bd.58, S.2448 (1925).

sprünglichen, instabilen α-Modifikation über eine Zwischenstufe C_β in das stabile Gel C_γ. So lassen sich die Unterschiede in den Adsorptionseigenschaften von Präparaten der Sorte C, von denen WALDSCHMIDT-LEITZ und HARTENECK berichtet haben, auf ihren wechselnden Gehalt an den beiden letzteren Tonerdemodifikationen, C_β und C_γ, zurückführen; von ihnen ist die Sorte C_γ, die bei längerer Aufbewahrung der Gele erhalten wird, für die Trennung der Pankreasproteasen besonders geeignet, sie adsorbiert das ereptische Enzym am auswählendsten, während man anzunehmen hat, dass die mit manchen Tonerdepräparaten beobachteten Störungen, nämlich eine viel stärkere Adsorbierbarkeit des Trypsins, auf einer Beimischung der ß-Modifikation beruhten. Zur Gewinnung der einheitlichen Pankreasproteasen wie des trypsinfreien Darmerepsins wenden wir daher die Tonerdesorte C_γ an, die auch die beständigste ist; ihre Adsorptionseigenschaften unterscheiden sich, wie die nachfolgenden Versuche zeigen, in ausgeprägter Weise von denen eines anderen, von WILLSTÄTTER, KRAUT und ERBACHER[1] beschriebenen Tonerdegels von der Zusammensetzung AlO·OH; dieses Adsorbens, für die Trennung von Maltase und Saccharase in Hefeauszügen am auswählendsten[2], erweist sich im vorliegenden Falle als ungeeignet. Es ist eine schöne Bestätigung für die chemische, nicht für die kolloidchemische Funktion von Adsorbentien, wenn es sich, wie unten beschrieben, zeigt, dass mit dem Wechsel in der chemischen Zusammensetzung, von $Al(OH)_3$ zu AlO·OH, eine wesentliche Veränderung der selektiven Adsorptionswirkungen verbunden ist.

---

1) Chem.Ber., Bd.58, S.2458 (1925).
2) a.a.O. u.zwar S.2462 (1925).

Es sei an dieser Stelle bemerkt, dass zur Bestimmung des Trypsins in den Versuchen dieser Arbeit ein von dem von E.WALDSCHMIDT-LEITZ und A.HARTENECK[1] früher beschriebenen abweichendes, empfindlicheres Verfahren diente, nämlich mit Kasein als Substrat, über dessen Bedingungen R.WILLSTÄTTER und E.WALDSCHMIDT-LEITZ mit G.KÜNSTNER demnächst berichten werden; die diesem Verfahren zugrunde liegende Einheit der tryptischen Leistung T.-(e.) ist der früher festgelegten äquivalent.

Versuch 1. Verhalten gegen Tonerde C_{γ}.

20 ccm Glycerinauszug aus frisch getrockneter Pankreasdrüse von Schweinen (enthaltend 57,6 T.-(e) neben 0,0236 P.Er.-E.) wurden nach dem Verdünnen mit 20 ccm H_2O + 1,50 ccm n-Acetatpuffer von pH = 3,8 viermal der Adsorption mit je 1,5 ccm Tonerdesuspension C_{γ} (= je 52,5 mg Al_2O_3) unterworfen; die vereinigten Adsorbate, die zweimal mit 20 ccm 20 %-igem Glycerin (durch Acetatpuffer auf p_H = 3,8 eingestellt) gewaschen wären, eluierte man mit 40 ccm 0,04 n-NH_3 (20 % Glycerin enthaltend), während man die Adsorptionsrestlösung mit n-NH_3 neutralisierte. In 38 ccm der Restlösung bestimmte man noch 34,6 T.-(e.) und 0,0006 P.Er.-E. und in der Elution 14,4 T.-(e.) neben 0,0071 P.Er.-E.; die Restlösung enthielt also 60 % vom angewandten Trypsin und 2,5 % vom Erepsin und die Elution 25 bzw. 30 %; der Erepsingehalt der Elution war infolge Enzymzerstörung zu gering.

Versuch 2. Verhalten gegen Tonerdesorte AlO·OH.

20 ccm Glycerinauszug (mit 32,2 T.-(e.) und 0,0520 P.Er.-E.), mit 20 ccm H_2O + 1,5 ccm n-Acetatpuffer

1) Vgl. dazu E.WALDSCHMIDT-LEITZ u. A.HARTENECK, H.S., Bd.147, S.286 u.zwar S.291 (1925).

von p_H = 3,8 verdünnt, adsorbierte ich viermal mit je 1,0 ccm Tonerdegel von der Zusammensetzung AlO·OH (= je 52,0 mg Al_2O_3) und eluierte die vereinigten, wie in Versuch 1 gewaschenen Adsorbate mit 40 ccm 0,04 n-NH_3 (20 % Glycerin enthaltend); 38 ccm der Restlösung enthielten dann 14,4 T.-(e.) und 0,040 P.Er.-E., während in der Elution 15,2 T.-(e.) neben 0,0076 P.Er.-E. nachgewiesen wurden. Der Gehalt der Restlösung belief sich also auf 45 % vom angewandten Trypsin und auf 77 % vom Erepsin, während die Elution 47 bzw. 15 % davon enthielt. Vom ereptischen Enzym war in diesem Falle nur wenig, vom tryptischen aber etwas mehr aufgenommen worden, die Adsorbierbarkeit der beiden Enzyme war also vertauscht.

3. Darstellung kinasefreien Trypsins.

Es war für den exakten Vergleich der hydrolytischen Leistungen von Trypsin und Trypsin-Kinase erforderlich, die Lösungen des Trypsins, die auch aus frisch getrocknetem Drüsenmaterial gewöhnlich in geringem Betrage aktiviert erhalten werden, in einheitlichem, aktivatorfreiem Zustande zu gewinnen. Beispiele für die Abtrennung der Enterokinase aus dem aktivierten enzymatischen System, auch aus dem spontan aktivierten, durch Tonerdeadsorption bei saurer Reaktion, sind von E. WALDSCHMIDT-LEITZ[1] vor einigen Jahren angeführt worden, aber das angewandte Verfahren, das nur quantitative, keine qualitativen Unterschiede im Adsorptionsverhalten ausnutzt, würde zu verlustreich sein, wollte man so, etwa durch seine wiederholte Anwendung auf die vom Erepsin befreiten Lösungen

1) H.S., Bd.132, S.181 u.zwar S.235 (1923/24).

des Trypsins, die Abtrennung der letzten Anteile des Aktivators unternehmen. Das Verfahren, das wir zur Gewinnung kinasefreien Trypsins aus den pankreatischen Auszügen einschlagen, besteht daher nicht in der Abtrennung des Aktivators allein, sondern in der Zerlegung der vorliegenden Gemische von Trypsin und Trypsin-Kinase in diese beiden Komponenten, deren Durchführung auf der Verwertung spezifischer enzymatischer Affinitäten beruht. So hat es sich ergeben, dass aus den Tonerdeadsorbaten des Gemisches von Trypsin und Trypsin-Kinase an verdünnte Lösungen beispielsweise von Kasein vorwiegend die aktivierte Komponente abgegeben wird und dass es gelingt, nun aus den Adsorbaten das kinasefreie Enzym in einheitlichem Zustande durch die Einwirkung verdünnten Alkalis abzulösen. Diese Erscheinung, deren Ursachen auf erweiterter Grundlage untersucht werden sollen, wird für die Erkenntnis des Einflusses der Enterokinase auf die Affinitätsverhältnisse des Enzyms von Bedeutung sein; es hat den Anschein, dass die spezifische Wirkung des Aktivators nicht oder nicht allein in einer Steigerung der Zerfallstendenz der Enzymsubstratverbindung, sondern dass sie in der Vermittlung der Bindung des Trypsins an gewisse Substrate besteht.[1)]

Es empfiehlt sich die Abtrennung von Trypsin-Kinase aus ihrem Gemische mit Trypsin, die wir nachstehend beschreiben und für deren Nachweis die Prüfung auf aktiviertes Enzym besonders empfindlich gestaltet wurde, erst nach der Befreiung vom Erepsin vorzunehmen

---

1) Mit dieser Auffassung steht die Beobachtung in Einklang, dass nur das aktivierte Trypsin gleich wie Enterokinase allein, nicht aber kinasefreies Enzym durch Fibrin adsorbiert wird.

und sie nur an schwach aktivierten Drüsenauszügen auszuführen; die Ausbeuten an kinasefreiem tryptischem E zym, die nur mässige sind, würden nach einer Wiederholung der Trennungsoperationen, wie sie bei stärker aktivierten Enzymlösungen erforderlich wäre (vgl. Versuch 4), zu geringfügig sein.

Versuch 3. 50 ccm Glycerinauszug aus Pankreasdrüse enthielten zufolge der Bestimmung 500 T.-(e.), davon nur etwa 6 T.-(e.) oder 1,2 % in aktivierter Form [0,10 ccm, mit Enterokinase aktiviert, 20 Min., 30°; 1,00 ccm 0,2 n-KOH (Kasein): 1,0 T.-(e.); 1,00 ccm, ohne Aktivierung durch Enterokinase, 1 Stunde, 30°; 0,25 ccm 0,2 n-KOH (Kasein): 0,12 T.-(e.)]. Man verdünnte sie mit 50 ccm H_2O + 5,0 ccm n-Acetatpuffer von p_H = 3,8 und befreite sie durch sechsmalige Einwirkung von je 7,0 ccm Tonerdesuspension C_γ (= je 245 mg Al_2O_3) von Erepsin. Die Mutterlauge der Adsorption enthielt dann in 100 ccm noch 90 T.-(e.), hiervon 0,75 T.-(e.) oder 0,8 % in aktiviertem Zustand [1,00 ccm, mit Enterokinase aktiviert, 20 Min., 30°; 0,90 ccm 0,2 n-KOH (Kasein): 0,90 T.-(e.); 4,0 ccm, ohne Aktivierung durch Enterokinase, 2 Stunden, 30°: 0,18 ccm 0,2 n-KOH (Kasein): 0,03 T.-(e.)].

30 ccm der Adsorptionsrestlösung [mit 27 T.-(e.), davon 0,23 T.-(e.) in aktivierter Form] nahm man nach der Neutralisation mit n-NH_3 (bei p_H = 7,0) durch zweimalige Einwirkung von je 7,0 ccm Tonerde C_γ (= je 245 mg Al_2O_3) auf und behandelte das Adsorbat zuerst mit 30 ccm neutraler 1 %iger Lösung von Kasein (Hammarsten), welche 20 % Glycerin enthielt, sodann nach zweimaligem Auswaschen mittels 20 ccm 20 %igem Glycerin mit 30 ccm 0,04 n-NH_3 (20 % Glycerin enthaltend).

Die Kaseinelution des Adsorbates enthielt den grössten Teil des aktivierten Trypsins, nämlich 0,15 T.-(e.) in aktivierter Form [4,0 ccm, ohne Aktivierung durch Enterokinase, 2 Stunden, 30°: 0,13 ccm 0,2 n-KOH (Kasein): 0,02 T.-(e.)].

In der mittels Ammoniak gewonnenen, mit Essigsäure neutralisierten Elution war keine Enterokinase mehr nachweisbar und sie enthielt mit 13,5 T.-(e.) noch 9 % vom gesamten Enzymgehalt des Drüsenauszugs [1,0 ccm, mit Enterokinase aktiviert, 20 Min., 30°: 0,45 ccm 0,2 n-KOH (Kasein): 0,45 T.-(e.); 5,0 ccm, ohne Aktivierung durch Enterokinase, 2 Stunden, 30°: 0,02 ccm 0,2 n-KOH (Kasein): 0,0 T.-(e.)].

Versuch 4. In 37,5 ccm Glycerinauszug aus Pankreasdrüse waren 562 T.-(e.) enthalten, davon 52,5 T.-(e.) oder 9,3 % in aktivierter Form [0,10 ccm mit Enterokinase aktiviert, 20 Min., 30°: 1,50 ccm 0,2 n-KOH (Kasein): 1,5 T.-(e.); 1,0 ccm, ohne Aktivierung durch Enterokinase, 1 Stunde, 30°: 1,42 ccm 0,2 n-KOH (Kasein): 1,4 T.-(e.)]. Man unterwarf sie nach dem Verdünnen mit 37,3 ccm H_2O + 3,0 ccm n-Acetatpuffer von p_H = 3,8 sechsmal der Adsorption mit je 5,0 ccm Tonerde C γ (= je 175 mg Al_2O_3); die Mutterlauge, die erepsinfrei war, wurde mit n-NH_3 neutralisiert (p_H = 7,0) und nun zweimal mit je 15,0 ccm der Tonerde (= je 525 mg Al_2O_3) adsorbiert. Das gewonnene trypsinhaltige Adsorbat behandelte man mit 75 ccm neutraler 1 %-iger Kaseinlösung, welche 20 % Glycerin enthielt, sodann zweimal mit je 20 ccm 20 %-igem Glycerin und endlich mit 75 ccm 0,01 n-NH_3 (20 % Glycerin enthaltend). In der letzten ammoniakalischen, mit Essigsäure neutralisierten Elution waren

noch insgesamt 35,6 T.-(e.) nachweisbar, und zwar 0,56 T.-(e.) oder 1,6 % in aktivierter Form [2,0 ccm, mit Enterokinase aktiviert, 20 Min., 30°: 0,95 ccm o,2 n-KOH (Kasein): 0,95 T.-(e.); 4,0 ccm, ohne Aktivierung durch Enterokinase, 2 Stdn., 30°: 0,20 ccm 0,2 n-KOH (Kasein): 0,03 T.-(e.)]. Die Abtrennung des aktivierten Enzyms war also nach dieser Operation noch nicht vollständig, während die erhaltene Lösung nur noch 6 % vom gesamten Enzymgehalte des Drüsenauszugs aufwies.

II. Enzymatische Hydrolyse des Clupeins.

Der Wiedergabe meiner Hydrolysenversuche mit den einzelnen Proteasen, die ich nachstehend tabellarisch vornehme, seien einige allgemeine Bemerkungen vorausgeschickt, die sich auf ihre nähere Ausführung beziehen. Zur Beschreibung der angewandten Enzympräparate ist nachzutragen, dass als ereptische Enzyme das einheitliche, von tryptischen Verunreinigungen befreite Erepsin aus Darmschleimhaut, sowie einheitliches Erepsin aus Hefe[1], nach dem Verfahren von R.WILLSTÄTTER und W.GRASSMANN[2] von Hefe-Trypsin getrennt, zur Anwendung kamen; als Papainpräparat diente käuflicher Succus Caricae Papayae (Merck), durch zweistündige Einwirkung überschüssiger Blausäure aktiviert.[3]

---

1) Dieses Enzym erwies sich gleich wie das pankreatische und das Darmerepsin gegenüber Clupein als indifferent.

2) H.S., Bd.153, S.250 u.zwar S.280 (1926).

3) Mit blausäurefreiem Papain wurde keine Hydrolyse des Clupeins beobachtet.

Die Einstellung der für die Enzymwirkung geeigneten Wasserstoffzahl, p_H = 8,4 für die tryptische, bzw. 7,8 für die ereptische, bzw. 7,0 für die Papainwirkung, und ihre Umstellung bewirkte man durch Zugabe von 0,2 n-NaOH bzw. HCl, also ohne Anwendung eines eigentlichen Puffers, der, wie Ammoniak-Ammonchloridpuffer, die Messung reaktionsfähiger Aminogruppen oder die titrimetrische Bestimmung des gebildeten Aminosäureanteils gestört hätte. Die Acidität der Versuchslösungen, die mit Indikatoren kontrolliert wurde, erfuhr im Laufe der einzelnen Hydrolysen keine für die Enzymwirkung wesentlichen Veränderungen.

Es bedarf nicht der Erwähnung, dass die für die einzelnen enzymatischen Reaktionen angegebenen Endwerte der Hydrolyse in allen Fällen, wenn ich auch in den Tabellen besondere Angaben hierüber unterlasse, durch die Wirkungslosigkeit weiterer Enzymzugabe sichergestellt wurden. In Fällen, in denen nach der Beendigung einer enzymatischen Wirkung für die Einheitlichkeit der Hydrolyse, die man mit anderen Enzymen weiterführte, Störungen aus der Aktivität des zuerst angewandten Enzyms zu befürchten waren, wurde dieses durch Erhitzen auf 70 - 80° inaktiviert; die Kontrollen der Acidität in alkoholischer Lösung, die ich vornahm, ergaben dabei in keinem Falle eine Veränderung, wie sie etwa bei eingetretener Anhydrisierung oder bei spontaner Hydrolyse hätte erfolgen sollen.

Die Bestimmung freier Aminogruppen nach van SLYKE erfolgte durch 10 Min. lange Einwirkung von salpetriger Säure. Für die Messung des gesamten Carboxylzuwachses, nämlich in 90 %ig-alkoholischer Lösung, verwandte man mit übereinstimmendem Ergebnis

Phenolphtalein oder Thymolphtalein als Indikator, während für die Ermittlung des auf freie Aminosäuren entfallenden Anteils, in 50 %-igem Alkohol, nach R.WILLSTÄTTER und E.WALDSCHMIDT-LEITZ[1] nur Phenolphtalein als Indikator diente. Die in der angeführten Untersuchung für den in 50 %-igem Alkohol erfassbaren Anteil der einzelnen Aminosäuren erbrachten Belege, für Alanin beispielsweise 28 %, werden nachstehend ergänzt mit den entsprechenden Angaben für die vier übrigen, als Clupeinbausteine bekannten Aminosäuren Arginin, Prolin, Valin und Serin. Unter Berücksichtigung ihrer Beteiligung am Aufbau des Clupeins errechnet sich aus den in Tab. 3 angegebenen Zahlen für den in 50 %-igem Alkohol titrierbaren Anteil der Mittelwert von 29 %; den in den nachstehenden Tab. 4 - 29 bei der Hydrolyse des Clupeins für die Beteiligung freier Aminosäure am Carboxylzuwachs angegebenen Betrag leitet man somit entsprechend WILLSTÄTTER und WALDSCHMIDT-LEITZ durch die Beziehung ab:

$$x = \frac{100\ (b-a)}{71},$$

worin x den prozentischen Anteil gebildeter Aminosäuren, b den in 90- und a den in 50 %-igem Alkohol gemessenen Aciditätszuwachs bedeuten. Wie eine einfache Rechnung ergibt, kann der nach dieser Beziehung ermittelte prozentische Aminosäureanteil auch Werte von über 100 erreichen, nämlich dann, wenn eine Abnahme in der absoluten Anzahl der Peptidmoleküle eintritt.

---

1) Chem.Ber., Bd.54, S.2988 u.zwar S.2991 (1921).

Tabelle 3.

Alkalimetrische Titration von Clupeinbausteinen.

Aminosäure	Gramm	Aciditätszuwachs (ccm 0,2 n-KOH) in 50 %ig. Alkohol	Aciditätszuwachs (ccm 0,2 n-KOH) in 90 %ig. Alkohol	Prozent der Theorie in 50 %ig. Alkohol	Prozent der Theorie in 90 %ig. Alkohol
Arginin[1]	0,0770	0,72	2,20	33	100
Prolin .	0,1356	1,15	5,69	20	96
Valin ..	0,1000	1,10	4,30	26	100
Serin ..	0,2000	2,75	9,41	35	99

1. Hydrolyse durch Trypsin : Trypsin-Kinase : Darmerepsin.

Tabelle 4.

Einwirkung von Trypsin.

5,0 Clupeinsulfat, lufttrocken; 50 ccm Trypsinlösung mit 21 T.-(e.); Gesamtvol. 250 ccm; p_H = 8,4; 30°; zur Analyse entnommen 10,0 ccm, entspr. 0,200 g Clupeinsulfat .

Zeit Std.	Aciditätszuwachs (ccm 0,2 n-KOH) in 50 %ig. Alk. beob.	in 50 %ig. Alk. ber. für 0,20 g Cl	in 90 %ig. Alk. beob.	in 90 %ig. Alk. ber. für 0,20 g Cl	Aminosäuren Prozent ber.	NH_2-Zuwachs (ccm 0,2 n.) beob.	NH_2-Zuwachs (ccm 0,2 n.) ber. für 0,20 g Cl
6	0,80	0,80	0,85	0,85	0	-	-
8	0,85	0,85	0,90	0,90	0	0,90	0,90
10	-	-	0,90	0,90	-	0,91	0,91

Tabelle 5.

Einwirkung von Trypsin-Kinase nach Trypsin.

123 ccm Hydrolysengemisch aus Tab. 4, mit 0,2 n-NaOH auf p_H = 8,4 eingestellt; 20 ccm aktiviertes Trypsin mit 8,8 T.-(e.); Gesamtvol. 148 ccm; 30°; zur Analyse entnommen 10,0 ccm, entsprechend 0,166 g Clupeinsulfat .

Zeit Std.	Aciditätszuwachs (ccm 0,2 n-KOH) in 50 %ig. Alk. beob.	in 50 %ig. Alk. ber. für 0,20 g Cl	in 90 %ig. Alk. beob.	in 90 %ig. Alk. ber. für 0,20 g Cl	Aminosäuren Prozent ber.	NH_2-Zuwachs (ccm 0,2 n.) beob	NH_2-Zuwachs (ccm 0,2 n.) ber. für 0,20 g Cl
18	1,16	1,40	2,21	2,67	68	-	-
26	1,19	1,43	2,21	2,67	66	1,96	2,36

1) Bestimmt nach Neutralisation der wässr. Lösung mittels 0,2 n-HCl gegen Bromthymolblau.

Tabelle 6.

Einwirkung von Darmerepsin nach Trypsin-Kinase nach Trypsin.

[84 ccm Hydrolysengem.aus Tab.5, mit 0,2 n-NaOH auf p_H = 7,8 eingestellt; 10 ccm Darmerepsin mit 0,026 Er.-E.; Gesamtvol. 110 ccm; 30°; zur Analyse entnommen 10,0 ccm, entspr. 0,127 g Clupeinsulfat].

Zeit Stdn.	Aciditätszuwachs (ccm 0,2 n-KOH)				Aminosäuren Proz. ber.	NH_2-Zuwachs (ccm 0,2 n.)	
	in 50 %igem Alk. beob.	in 50 %igem Alk. ber.für 0,20 g Cl	in 90 %igem Alk. beob.	in 90 %igem Alk. ber.für 0,20 g Cl		beob	ber.für 0,20 g Cl
3	-	-	0,37	0,58	-	-	-
9	0,32	0,50	0,57	0,90	56	-	-
12	-	-	0,60	0,94	-	0,61	0,96

2. Hydrolyse durch Trypsin: Darmerepsin: Trypsin-Kinase: Darmerepsin.

Tabelle 7.

Einwirkung von Trypsin.

[5,0 g Clupeinsulfat, lufttr.; 50 ccm Trypsinlösung mit 50 T.-(e.) Gesamtvol.200 ccm; p_H = 8,4; 30°; zur Analyse entnommen 10,0 ccm, entspr. 0,250 g Clupeinsulfat].

Zeit Stdn.	Aciditätszuwachs (ccm 0,2 n-KOH)				Aminosäuren Proz. ber.	NH_2-Zuwachs (ccm 0,2 n.)	
	in 50 %igem Alk. beob.	in 50 %igem Alk. ber.für 0,20 g Cl	in 90 %igem Alk. beob.	in 90 %igem Alk. ber.für 0,20 g Cl		beob.	ber.für 0,20 g Cl
4	1,10	0,88	1,12	0,90	o	-	-
6	1,12	0,89	1,15	0,92	0	1,15	0,92

Tabelle 8.

Einwirkung von Darmerepsin nach Trypsin.

[150 ccm Hydrolysengemisch aus Tab.7, 30 Min.auf 70-80° erhitzt und mit 0,2 n-NaOH auf p_H = 7,8 eingest.; 20 ccm Darmerepsin mit 0,0204 Er.-E.; Gesamtvol. 208 ccm; 30°; zur Analyse entnommen 10,0 ccm, entspr. 0,180 g Clupeinsulfat].

Zeit Stdn.	Aciditätszuwachs (ccm 0,2 n-KOH)				Aminosäuren Proz. ber.	NH_2-Zuwachs (ccm 0,2 n.)	
	in 50 %igem Alk. beob.	in 50 %igem Alk. ber.für 0,20 g Cl	in 90 %igem Alk. beob	in 90 %igem Alk. ber.für 0,20 g Cl		beob.	ber.für 0,20 g Cl
2	0,28	0,31	0,71	0,79	76	-	-
3	0,32	0,35	0,86	0,93	80	0,88	0,98
6	0,32	0,35	0,86	0,93	80	0,83	0,92

Tabelle 9.

Einwirkung von Trypsin-Kinase nach Darmerepsin nach Trypsin.

[74 ccm Hydrolysengem. aus Tab.8, 30 Min.auf 70-80° erhitzt u. mit 0,2 n-NaOH auf p_H = 8,4 eingestellt; 10 ccm aktiviertes Trypsin mit 10,0 T.-(e.); Gesamtvol. 96 ccm; 30°; zur Analyse entnommen 10,0 ccm entspr. 0,139 g Clupeinsulfat].

Zeit Stdn.	Aciditätszuwachs (ccm 0,2 n-KOH)				Aminosäuren Proz. ber.	NH_2-Zuwachs (ccm 0,2 n.)	
	in 50 %igem Alk. beob.	in 50 %igem Alk. ber.für 0,20 g Cl	in 90 %igem Alk. beob.	in 90 %igem Alk. ber.für 0,20 g Cl		beob.	ber.für 0,20 g Cl
10	0,25	0,36	0,62	0,89	73	-	-
20	0,25	0,36	0,62	0,89	73	0,57	0,83

Tabelle 10.

Einwirkung von Darmerepsin nach Trypsin-Kinase nach Darmerepsin nach Trypsin.

[63 ccm Hydrolysengem. aus Tab.9; 10 ccm Darmerepsin mit 0,0152 Er.-E.; Gesamtvolumen 86 ccm; p_H = 7,8; 30°; zur Analyse entnommen 10,0 ccm entspr. 0,102 g Clupeinsulfat].

Zeit Stdn.	Aciditätszuwachs (ccm 0,2 n-KOH)				Aminosäuren Proz. ber.	NH_2-Zuwachs (ccm 0,2 n.)	
	in 50 %igem Alk. beob.	in 50 %igem Alk. ber.für 0,20 g Cl	in 90 %igem Alk. beob.	in 90 %igem Alk. ber.für 0,20 g Cl		beob.	ber.für 0,20 g Cl
6	-0,52	-1,04	0,70	1,40	192	-	-
8	-0,52	-1,04	0,85	1,70	227	-	-
22	-	-	0,85	1,70	-	0,79	1,58

3. Hydrolyse durch Trypsin-Kinase. Darmerepsin.

Tabelle 11.

Einwirkung von Trypsin-Kinase.

[5,0 g Clupeinsulfat, lufttr.; 20 ccm aktiviertes Trypsin mit 7,25 T.-(e.); Gesamtvol. 200 ccm; p_H = 8,4; 50°; zur Analyse entnommen 10,0 ccm, entspr. 0,200 g Clupeinsulfat].

Zeit Stdn.	Aciditätszuwachs (ccm 0,2 n-KOH) in 50 %igem Alk. beob.	in 50 %igem Alk. ber. für 0,20 g Cl	in 90 %igem Alk. beob.	in 90 %igem Alk. ber. für 0,20 g Cl	Aminosäuren Proz. ber.	NH_3-Zuwachs (ccm 0,2 n.) beob.	NH_3-Zuwachs (ccm 0,2 n.) ber. für 0,20 g Cl
0,5	0,82	0,82	0,88	0,88	9	-	-
0,75	0,97	0,97	1,14	1,14	14	-	-
1,25	1,22	1,22	1,57	1,57	31	-	-
10	2,00	2,00	3,10	3,10	50	-	-
24	2,04	2,04	3,10	3,10	48	3,15	3,15
Nach Zugabe von weiteren 20 ccm Enzym 7,25 T.-(e.), p_H = 8,4; 10,0 ccm, entspr. 0,179 g Clupeinsulfat:							
6	0,00	0,00	0,02	0,03	-	-	-
21	0,00	0,00	0,02	0,03	-	-	-

Tabelle 12.

Einwirkung von Darmerepsin nach Trypsin-Kinase.

[45 ccm Hydrolysengem. aus Tab.11; mit 0,2 n-HCl auf p_H = 7,8 eingestellt; 10 ccm Darmerepsin mit 0,026 Er.-E.; Gesamtvolumen 56 ccm; 30°; zur Analyse entnommen 10,0 ccm entspr. 0,144 g Clupeinsulfat].

Zeit Stdn.	Aciditätszuwachs (ccm 0,2 n-KOH) in 50 %igem Alk. beob.	in 50 %igem Alk. ber. für 0,20 g Cl	in 90 %igem Alk. beob.	in 90 %igem Alk. ber. für 0,20 g Cl	Aminosäuren Proz. ber.	NH_3-Zuwachs (ccm 0,2 n.) beob.	NH_3-Zuwachs (ccm 0,2 n.) ber. für 0,20 g Cl
11	0,17	0,24	1,10	1,53	117	1,24	1,72
31	-	-	1,10	1,53	-	1,24	1,72

4. Hydrolyse durch Trypsin: Hefeerepsin.

Tabelle 13.

Einwirkung von Trypsin.

[5,0 g Clupeinsulfat, lufttr.; 50 ccm Trypsinlösung mit 15 T.(e.) Gesamtvol. 250 ccm; p_H = 8,4; 30°; zur Analyse entnommen 10,0 ccm entspr. 0,200 g Clupeinsulfat].

Zeit Stdn.	Aciditätszuwachs (ccm 0,2 n-KOH)				Aminosäuren Proz. ber.	NH_2-Zuwachs (ccm 0,2 n.)	
	in 50 %igem Alk. beob.	in 50 %igem Alk. ber.für 0,20 g Cl	in 90 %igem Alk. beob.	in 90 %igem Alk. ber.für 0,20 g Cl		beob.	ber.für 0,20 g Cl
5	0,67	0,67	0,77	0,77	0	-	-
7	0,82	0,82	0,94	0,94	0	-	-
9	0,82	0,82	0,92	0,92	0	0,96	0,98

Tabelle 14.

Einwirkung von Hefeerepsin nach Trypsin.

[100 ccm Hydrolysengem. aus Tab.13, mit 0,2 n-NaOH auf p_H = 7,8 eingestellt; 50 ccm Hefeerepsin mit 12,25 Hefe-Er.-E.; Gesamtvol. 157 ccm; 30°; zur Analyse entn. 10,0 ccm, entspr.0,127 g Clupeinsulfat].

Zeit Stdn.	Aciditätszuwachs (ccm 0,2 n-KOH)				Aminosäuren Proz. ber.	NH_2-Zuwachs (ccm 0,2 n.)	
	in 50 %igem Alk. beob.	in 50 %igem Alk. ber.für 0,20 g Cl	in 90 %igem Alk. beob.	in 90 %igem Alk. ber.für 0,20 g Cl		beob.	ber.für 0,20 g Cl
2	0,00	0,00	0,05	0,08	-	-	-
6	0,00	0,00	0,05	0,08	-	0,07	0,12

5. Hydrolyse durch Trypsin: Papain-Blausäure: Trypsin-Kinase: Darmerepsin.

Tabelle 15: Einwirkung von Trypsin.

[5,0 g Clupeinsulfat, lufttr.; 50 ccm Trypsinlösung mit 15 T.(e.) Gesamtvol. 250 ccm; p_H = 8,4; 30°; zur Analyse entnommen 10,0 ccm entspr. 0,200 g Clupeinsulfat].

Zeit Stdn.	Aciditätszuwachs (ccm 0,2 n-KOH)				Aminosäuren Proz. ber.	NH_2-Zuwachs (ccm 0,2 n.)	
	in 50 %igem Alk. beob.	in 50 %igem Alk. ber.für 0,20 g Cl	in 90 %igem Alk. beob.	in 90 %igem Alk. ber.für 0,20 g Cl		beob.	ber.für 0,20 g Cl
7	0,82	0,82	0,94	0,94	0	-	-
9	0,82	0,82	0,92	0,92	0	0,96	0,96

Tabelle 16.

Einwirkung von Papain. Blausäure nach Trypsin.

[200 ccm Hydrolysengem. aus Tab.15, 30 Min. auf 70-80° erhitzt und mit 0,2 n.-HCl auf p_H = 7,0 eingestellt; 25 ccm aktiviertes Papain mit 250 Papain-E.; Gesamtvol. 225 ccm, 30°; zur Analyse entnommen 10,0 ccm entspr. 0,178 g Clupeinsulfat].

Zeit Stdn.	Aciditätszuwachs (ccm 0,2 n-KOH)				Aminosäuren Proz. ber.	NH_2-Zuwachs (ccm 0,2 n.)	
	in 50 %igem Alk.		in 90 %igem Alk.				
	beob.	ber.für 0,20 g Cl	beob.	ber.für 0,20 g Cl		beob.	ber.für 0,20 g Cl
2	-	-	0,75	0,84	-	-	-
4	0,80	0,90	0,80	0,90	0	-	-
8	0,80	0,90	0,80	0,90	0	0,80	0,90

Tabelle 17.

Einwirkung von Trypsin-Kinase nach Papain-Blausäure nach Trypsin.

[100 ccm Hydrolysengem. aus Tab.16, mittels Durchblasen von Luft von Blausäure befreit u. mit 0,2 n-NaOH auf p_H = 8,4 eingestellt; 20 ccm aktiviertes Trypsin mit 6,0 T.-(e.); Gesamtvol. 136 ccm; 30°; zur Analyse entnommen 10,0 ccm, entspr. 0,126 g Clupeinsulf.].

Zeit Stdn.	Aciditätszuwachs (ccm 0,2 n-KOH)				Aminosäuren Proz. ber.	NH_2-Zuwachs (ccm 0,2 n.)	
	in 50 %igem Alk.		in 90 %igem Alk.				
	beob.	ber.für 0,20 g Cl	beob.	ber.für 0,20 g Cl		beob.	ber.für 0,20 g Cl
7	0,58	0,92	0,70	1,10	23	-	-
13	-	-	0,73	1,15	-	0,78	1,25

Tabelle 18.

Einwirkung von Darmerepsin nach Trypsin-Kinase nach Papain-Blausäure nach Trypsin.

[60 ccm Hydrolysengem. aus Tab.17; 10 ccm Darmerepsin mit 0,026 Er.-E.; p_H = 7,8; 30°; zur Analyse entnommen 10,0 ccm, entspr. 0,109 g Clupeinsulfat].

Zeit Stdn.	Aciditätszuwachs (ccm 0,2 n-KOH)				Aminosäuren Proz. ber.	NH_2-Zuwachs (ccm 0,2 n.)	
	in 50 %igem Alk.		in 90 %igem Alk.				
	beob.	ber.für 0,20 g Cl	beob.	ber.für 0,20 g Cl		beob.	ber.für 0,20 g Cl
18	0,20	0,37	0,95	1,74	110	0,96	1,76
32	-	-	0,95	1,74	-	-	-

6. Hydrolyse durch Trypsin: Papain-Blausäure: Darmerepsin: Trypsin-Kinase: Darmerepsin.

Tabelle 19: Einwirkung von Trypsin.

[5,0 g Clupeinsulfat, lufttr.; 50 ccm Trypsinlösung mit 50 T.-(e.) Gesamtvol. 200 ccm; p_H = 8,4; 30°; zur Analyse entnommen 10,0 ccm entspr. 0,250 g Clupeinsulfat].

Zeit Stdn.	Aciditätszuwachs (ccm 0,2 n-KOH)				Aminosäuren	NH_2-Zuwachs (ccm 0,2 n.)	
	in 50 %igem Alk.		in 90 %igem Alk.				
	beob.	ber. für 0,20 g Cl	beob.	ber. für 0,20 g Cl	Proz. ber.	beob.	ber. für 0,20 g Cl
4	1,12	0,90	1,12	0,90	0	-	-
6	1,15	0,92	1,14	0,92	0	1,20	0,96

Tabelle 20.

Einwirkung von Papain-Blausäure nach Trypsin.

[182 ccm Hydrolysengem. aus Tab.19, 30 Min. auf 70-80° erhitzt u. mit 0,2 n-HCl auf p_H = 7,0 eingestellt; 20 ccm aktiviertes Papain mit 200 Papain-E., Gesamtvol. 240 ccm; 30°; zur Analyse entnommen 10,0 ccm, entspr. 0,180 g Clupeinsulfat].

Zeit Stdn.	Aciditätszuwachs (ccm 0,2 n-KOH)				Aminosäuren	NH_2-Zuwachs (ccm 0,2 n.)	
	in 50 %igem Alk.		in 90 %igem Alk.				
	beob.	ber. für 0,20 g Cl	beob.	ber. für 0,20 g Cl	Proz. ber.	beob	ber. für 0,20 g Cl
5	0,68	0,75	0,73	0,82	0	-	-
10	0,74	0,82	0,78	0,87	0	0,82	0,91
24	0,72	0,80	0,78	0,87	0	0,85	0,94

Tabelle 21.

Einwirkung von Darmerepsin nach Papain-Blausäure nach Trypsin.

[180 ccm Hydrolysengemisch aus Tab.20, mittels Durchblasen von Luft von Blausäure befreit u. mit 0,2 n-NaOH auf p_H = 7,8 eingestellt; 10 ccm Darmerepsin mit 0,0152 Er.-E.; Gesamtvol. 112 ccm; 30° zur Analyse entn. 10,0 ccm, entspr. 0,128 g Clupeinsulfat].

Zeit Stdn.	Aciditätszuwachs (ccm 0,2 n-KOH)				Aminosäuren	NH_2-Zuwachs (ccm 0,2 n.)	
	in 50 %igem Alk.		in 90 %igem Alk.				
	beob.	ber. für 0,20 g Cl	beob.	ber. für 0,20 g Cl	Proz. ber.	beob.	ber. für 0,20 g Cl
24	0,13	0,20	0,85	1,33	118	-	-
36	0,16	0,25	0,87	1,36	113	0,77	1,20

Tabelle 22.

Einwirkung von Trypsin-Kinase nach Darmerepsin nach Papain-Blausäure nach Trypsin.

[70 ccm Hydrolysengem aus Tab.21, 30 Min. auf 70-80° erhitzt u. mit 0,2 n-NaOH auf p_H = 8,4 eingestellt; 10 ccm aktiviertes Trypsin mit 5,0 T.-(e.); H_2 Gesamtvol.86 ccm; 30°; zur Analyse entnommen 10,0 ccm entspr. 0,104 g Clupeinsulfat].

Zeit Stdn.	Aciditätszuwachs (ccm 0,2 n-KOH)				Aminosäuren Proz.	NH_2-Zuwachs (ccm 0,2 n.)	
	in 50 %igem Alk. beob.	in 50 %igem Alk. ber.für 0,20 g Cl	in 90 %igem Alk. beob.	in 90 %igem Alk. ber.für 0,20 g Cl		beob.	ber.für 0,20 g Cl
23	-	-	0,39	0,75	-	-	-
45	0,30	0,57	0,39	0,75	33	0,34	0,65

Tabelle 23.

Einwirkung von Darmerepsin nach Trypsin.Kinase nach Darmerepsin nach Papain-Blausäure nach Trypsin.

[56 ccm Hydrolysengem. aus Tab.22; 10 ccm Darmerepsin mit 0,0152 Er.-E.; Gesamtvol.66 ccm; p_H = 7,8; 30°; zur Analyse entnommen 10,0 ccm entspr. 0,088 g Clupeinsulfat].

Zeit Stdn.	Aciditätszuwachs (ccm 0,2 n-KOH)				Aminosäuren Proz.	NH_2-Zuwachs (ccm 0,2 n.)	
	in 50 %igem Alk. beob.	in 50 %igem Alk. ber.für 0,20 g Cl	in 90 %igem Alk. beob.	in 90 %igem Alk. ber.für 0,20 g Cl		beob.	ber.für 0,20 g Cl
5	-	-	0,22	0,50	-	-	-
24	0,13	0,28	0,24	0,54	67	-	-

7. Hydrolyse durch Papain-Blausäure: Trypsin: Trypsin-Kinase: Darmerepsin.

Tabelle 24: Einwirkung von Papain-Blausäure.

[5,0 g Clupeinsulfat, lufttr.; 25 ccm aktiviertes Papain mit 250 Papain-E.; Gesamtvol. 200 ccm; p_H = 7,0; 30°; zur Analyse entnommen 10,0 ccm, entspr. 0,250 g Clupeinsulfat].

Zeit Stdn.	Aciditätszuwachs (ccm 0,2 n-KOH)				Aminosäurer Proz.	NH_2-Zuwachs (ccm 0,2 n.)	
	in 50 %igem Alk. beob.	in 50 %igem Alk. ber.für 0,20 g Cl	in 90 %igem Alk. beob.	in 90 %igem Alk. ber.für 0,20 g Cl		beob.	ber.für 0,20 g Cl
12	1,20	0,96	1,15	0,92	0	-	-
20	1,20	0,96	1,17	0,94	0	1,04	0,85

Tabelle 25.

Einwirkung von Trypsin nach Papain-Blausäure.

[150 ccm Hydrolysengemisch aus Tab.24, mittels Durchblasen von Luft von Blausäure befreit u. mit 0,2 n-NaOH auf p_H = 8,4 eingestellt; 80 ccm Trypsin mit 25,2 T.-(e); Gesamtvol.250 ccm, 30°; zur Analyse entnommen 10,0 ccm, entspr. 0,144 g Clupeinsulfat].

Zeit Stdn.	Aciditätszuwachs (ccm 0,2 n-KOH)				Aminosäuren Proz.	NH_2-Zuwachs (ccm 0,2 n.)	
	in 50 %igem Alk.		in 90 %igem Alk.				
	beob.	ber.für 0,20 g Cl	beob.	ber.für 0,20 g Cl		beob.	ber.für 0,20 g Cl
4	0,37	0,51	0,47	0,65	0	0,45	0,62
7	0,53	0,74	0,56	0,79	0	0,70	0,96
16	0,53	0,74	0,58	0,81	0	0,68	0,94

Tabelle 26.

Einwirkung von Trypsin-Kinase nach Trypsin nach Papain-Blausäure.

[146 ccm Hydrolysengem. aus Tab 25, mit 0,2 n-NaOH auf p_H = 8,4 eingestellt; 20 ccm aktiviertes Trypsin mit 8,7 T.-(e.); Gesamtvolumen 166 ccm, 30°; zur Analyse entnommen 10,0 ccm, entspr. 0,126 g Clupeinsulfat].

Zeit Stdn.	Aciditätszuwachs (ccm 0,2 n-KOH)				Aminosäuren Proz.	NH_2-Zuwachs (ccm 0,2 n.)	
	in 50 %igem Alk.		in 90 %igem Alk.				
	beob.	ber.für 0,20 g Cl	beob.	ber.für 0,20 g Cl		beob.	ber.für 0,20 g Cl
45	0,40	0,63	1,04	1,65	84	-	-
56	0,40	0,63	1,06	1,68	84	1,06	1,68

Tabelle 27.

Einwirkung von Darmerepsin nach Trypsin-Kinase nach Trypsin nach Papain-Blausäure.

[60 ccm Hydrolysengem. aus Tab 26, mit 0,2 n-NaOH auf p_H = 7,8 eingestellt; 10 ccm Darmerepsin mit 0,026 Er.-E.; 30°; zur Analyse entnommen 10,0 ccm, entspr. 0,108 g Clupeinsulfat].

Zeit Stdn.	Aciditätszuwachs (ccm 0,2 n-KOH)				Aminosäuren Proz. ber.	NH_2-Zuwachs (ccm 0,2 n.)	
	in 50 %igem Alk.		in 90 %igem Alk.				
	beob.	ber.für 0,20 g Cl	beob.	ber.für 0,20 g Cl		beob	ber.für 0,20 g Cl
12	0,00	0,00	0,62	1,13	140	-	-
17	0,00	0,00	0,63	1,15	140	0,60	1,11

8. Hydrolyse durch Papain-Blausäure: Darmerepsin.

Tabelle 28.

Einwirkung von Papain-Blausäure.

[5,0 g Clupeinsulfat, lufttrocken; 25 ccm aktiviertes Papain mit 250 Papaineinheiten; Gesamtvolumen 200 ccm; p_H = 7,0; 30°; zur Analyse entnommen 10,0 ccm, entspr. 0,250 g Clupeinsulfat].

Zeit Stdn.	Aciditätszuwachs (ccm 0,2 n-KOH)				Aminosäuren	NH_2-Zuwachs (ccm 0,2 n.)	
	in 50 %igem Alk.		in 90 %igem Alk.				
	beob.	ber.für 0,20 g Cl	beob.	ber.für 0,20 g Cl	Proz. ber.	beob.	ber.für 0,20 g Cl
6	1,10	0,89	1,15	0,92	0	1,25	1,00
8	1,15	0,92	1,15	0,92	0	1,28	1,02

Tabelle 29.

Einwirkung von Darmerepsin nach Papain-Blausäure.

[92 ccm Hydrolysengemisch aus Tab.28, mittels Durchblasen von Luft von Blausäure befreit und mit 0,2 n-NaOH auf p_H = 7,8 eingestellt; 10,0 ccm Darmerepsin mit 0,0168 Er.-E.; Gesamtvolumen 114 ccm; 30°; zur Analyse entnommen 10,0 ccm, entspr. 0,209 g Clupeinsulfat].

Zeit Stdn.	Aciditätszuwachs (ccm 0,2 n-KOH)				Aminosäuren	NH_2-Zuwachs (ccm 0,2 n.)	
	in 50 %ig m Alk.		in 90 %igem Alk.				
	beob.	ber.für 0,20 g Cl	beob.	ber.für 0,20 g Cl	Proz. ber.	beob.	ber.für 0,20 g Cl
8	-	-	2,23	2,13	-	-	-
16	0,52	0,50	2,28	2,18	107	2,35	2,24
Nach Zugabe von weiteren 10 ccm Enzym (0,0168 Er.-E.; p_H = 7,8:							
6	0,02	0,02	0,00	0,00			

LEBENSLAUF.

Am 25.Dezember 1900 wurde ich zu Landshut als Sohn des Oberstudienrates Adolf Schäffner geboren. Ich erhielt das Reifezeugnis im Jahre 1919 an dem humanistischen Gymnasium Landshut. Im Winter-Semester 1919/20 begann ich an der Universität München das Studium der Chemie, machte im Mai 1923 den ersten, im Juni 1924 den zweiten Teil der Verbandsprüfung und begann dann unter Leitung des Herrn Dr.Ernst WALD-SCHMIDT-LEITZ meine Doktorarbeit, die ich im Juli 1926 zu Ende führte.